

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**Activación del nicho de células troncales
del folículo piloso mediante la fotogeneración de
especies reactivas de oxígeno.**

Tesis Doctoral

Elisa Carrasco Cerro

Madrid, 2014

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha contado con la siguiente financiación:

- Elisa Carrasco Cerro ha disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, con referencia AP2008-00375, durante el período comprendido entre el 01/08/2009 y el 31/07/2013.

- Título del proyecto: Homeostasis y patología cutánea. Desarrollo de modelos celulares y animales para el estudio de vías de señalización epidérmica y ensayo de nuevos abordajes terapéuticos (S2010/BMD-2359). Entidad financiadora: Comunidad de Madrid. Duración: 01/2012 hasta 12/2015. Proyecto coordinado; IP del grupo: Ángeles Juarranz, Jesús Espada; Coordinador: Miguel Quintanilla.

- Título del proyecto: Nuevos mecanismos de regulación funcional de células madre epidérmicas con aplicación potencial en medicina regenerativa (SAF2011-23493). Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Organismo: Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM. Duración: Desde 01/2012 hasta 12/2013. Investigador responsable: Jesús Espada.

- Título del proyecto: Caracterización de mecanismos moleculares de aplicación potencial para un uso terapéutico de células progenitoras epidérmicas (SAF2008-00609). Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Organismo: Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM. Duración: Desde 01/01/2009 hasta 31/12/2011. Investigador responsable: Jesús Espada.

A mi padre
y al recuerdo de mi madre

“Únicamente con la ayuda y las concesiones mutuas, un organismo que agrupe mayorías o minorías puede encontrar su plena armonía y realizar serios progresos.”

Jigoro Kano

Agradecimientos

A mis directores, Jesús Espada y Ángeles Juarranz, que me han guiado durante todo este trabajo. Por sus consejos, sus correcciones meticulosas y su paciencia infinita cuando le doy mil vueltas a cada experimento y a cada párrafo. Pero sobre todo, por ser tan cercanos y por enseñarme que rendirse nunca es una opción. ¡Muchas gracias!

A toda la gente con la que he compartido laboratorio en estos años. Especialmente a María, por todos los momentos que hemos pasado juntas dentro y fuera del laboratorio, por las risas, por aguantar mis caras largas en los días de estrés y por estar siempre dispuesta a echarme una mano. También a Alfonso, por ser un buen amigo y porque siempre está ahí para aconsejarme. Y a Joyce, por ayudarme con los protocolos.

A Miguel Quintanilla, por toda la ayuda que me ha prestado. A todas las personas con las que he coincidido en su laboratorio, que se han convertido en buenas amigas: Patricia, María Marta, Gaëlle, Esther, Ester, Lucía, Cecilia... Al grupo de Amparo Cano, porque siempre que he necesitado algún favor me han echado una mano. A Jaime Renart, por el espacio cedido en mi etapa inicial en el IIB. Y a los estudiantes del laboratorio de Ángeles Juarranz, por recibirme con buena cara cada vez que aparezco como un torbellino y facilitarme siempre las cosas. En especial a Alejandra, por el buen trabajo que hemos hecho juntas y por confiar en mí.

A Michael R. Hamblin, por dirigirme durante mi estancia en Boston, y en especial a Daniela Vecchio, porque desde el primer momento nos entendimos a la perfección y desde entonces me ha demostrado ser una gran persona, de la que he aprendido un montón de cosas. Y a Ana Elisa, que me ayudó cada día, siempre con una sonrisa.

A todas las personas que desde fuera del laboratorio me han apoyado durante todo este camino. A María, Marisa y Marga, porque sé que siempre puedo contar con ellas. A Rafa, Alfredo, Miguel y Bárbara, que han estado pendientes en todo momento, ¡y a María! A Carmen, por los buenos ratos para reírnos y desahogarnos juntas. A mi gente de judo, en especial a Miguel, y de patinaje, porque sin el respiro del tatami y los patines no sé de dónde habría sacado fuerzas para llegar hasta aquí. Y a los aikidokas, que han sido un gran apoyo.

A Ali, por ser mucho más que una amiga. Por la confianza mutua, por escucharme siempre y por estar a tan solo un silbido en todo momento y desde cualquier rincón del planeta.

A mi familia, en especial a mi padre, por ayudarme siempre sin pensarlo ni un segundo, y a mi hermano, por su forma de ser y por su creatividad. A Manolo y Margot, por arroparme.

Y a Manu, por estar a mi lado cada día, en los momentos buenos y en los menos buenos. Por entenderme mejor que nadie, en la ciencia y fuera de ella. Por su ayuda infinita, sus ideas, el tiempo y el esfuerzo que me regala.

A todos, muchas gracias.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFAP110	Proteína asociada a filamentos de actina p110 (<i>Actin Filament Associated Protein</i>)
ALA	Ácido 5-aminolevulínico (<i>5-Aminolevulinic Acid</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
Cy3	Cianina 3 (<i>Cyanine 3</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DF	2'7'-dicloro-fluoresceína
DHF-DA	2'7'-dicloro-dihidrofluoresceína diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada (<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares (<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>)
FAK	Quinasa de adhesión focal (<i>Focal Adhesion Kinase</i>)
FGF7	Factor de crecimiento de fibroblastos 7 (<i>Fibroblast Growth Factor 7</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
FS	Fotosensibilizador
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
H-E	Hematoxilina-Eosina
HRP	Peroxidasa de rábano picante (<i>horseradish peroxidase</i>)
IF	Inmunofluorescencia
IGF-2	Factor de crecimiento similar a insulina tipo 2 (<i>Insuline-like Growth Factor type 2</i>)
IHQ	Inmunohistoquímica
iPS	(Células) pluripotentes inducidas (<i>induced Pluripotent Stem cells</i>)
IR	Receptor de insulina (<i>Insulin Receptor</i>)
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal (<i>c-Jun NH₂-terminal Kinases</i>)
K1	Queratina 1 (<i>Keratin 1</i>)
K10	Queratina 10 (<i>Keratin 10</i>)
K14	Queratina 14 (<i>Keratin 14</i>)
K15	Queratina 15 (<i>Keratin 15</i>)
K5	Queratina 5 (<i>Keratin 5</i>)
KGf	Factor de crecimiento de queratinocitos (<i>Keratinocyte Growth Factor</i>)
LED	Diodos Emisores de Luz (<i>Light Emitting Diodes</i>)
Lef	Factores potenciadores linfoides (<i>lymphoid enhancer factor</i>)
LRC	Células que retienen la marca (<i>Label Retaining Cells</i>)
m-ALA	Metil-δ-aminolevulinato

MAPK	Proteína-quinasas activadas por mitógeno (<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MP6	Receptor de manosa-6-fosfato (<i>Manose-6-Phosphate receptor</i>)
MRP	Proteínas reguladas por mitógeno (<i>Mitogen Regulated Proteins</i>)
mTOR	Diana de la rapamicina en células de mamífero (<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>)
NAC	N-acetil-cisteína (N-Acetyl Cysteine)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NET	Solución tamponada que contiene NP-40 y EDTA
NOX	NADPH oxidasa
PBGD	Porfobilinógeno desaminasa
PBS	Solución salina tamponada de fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa (<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>)
PKB	Proteína quinasa B (<i>Protein Kinase B</i>)
PLF	Proliferinas
PLF2	Proliferina 2
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluoride</i>)
PpIX	Protoporfirina IX
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de prolactina (<i>Prolactin Receptor</i>)
PTG	Solución de PBS con Triton X-100 y Gelatina
PTK	Proteína tirosina-quinasas (<i>Protein Tyrosine Kinases</i>)
PTP	Proteínas tirosina-fosfatasas (<i>Protein Tyrosine Phosphatases</i>)
PVDF	Fluoruro de polivinilideno (<i>Polyvinylidene fluoride</i>)
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real, a partir de ARNm retrotranscrito
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RTK	Receptores tirosina-quinasa (<i>Receptor Tyrosine Kinases</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SFK	Familia Src de proteínas tirosina-quinasas (<i>Src Family of protein tyrosine Kinases</i>)
TA	Temperatura ambiente
TA	(Células) de amplificación en tránsito (<i>Transit Amplifying cells</i>)
Tcf	Factores de células T (<i>T cell factor</i>)
TF	Tratamiento fotodinámico
Thr	Treonina
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate)
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling</i>
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
WB	Inmunoblot (<i>Western blot</i>)
γH2AX	Histona H2AX fosforilada en la Ser139

Resumen

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen intracelularmente por distintos mecanismos y tienen efectos perjudiciales para las células, estando implicadas en procesos patológicos y de envejecimiento. No obstante, numerosas observaciones sugieren que la producción controlada de ROS está implicada en la regulación de distintos procesos celulares como proliferación, diferenciación, muerte programada o remodelación del citoesqueleto, aunque se desconoce en gran medida la importancia de este mecanismo regulador *in vivo*.

El tratamiento fotodinámico (TF) es un procedimiento capaz de inducir la producción endógena de ROS mediante la combinación de tres elementos: un compuesto fotosensibilizador (FS) acumulado en el tejido diana, luz y oxígeno molecular. Su uso clínico se basa en la producción de niveles elevados de ROS en los tejidos tumorales en respuesta al TF, que mueren selectivamente como consecuencia del estrés oxidativo. Sin embargo, la producción intracelular de bajos niveles de ROS inducida por el TF podría tener un efecto estimulador en el tejido.

En este trabajo se ha utilizado el TF con m-ALA y luz roja para analizar *in vivo* el efecto de la producción endógena de ROS en la regulación de la homeostasis cutánea en ratón. Los resultados obtenidos indican que la producción endógena, local y transitoria de ROS inducida por el TF activa la proliferación en el nicho de células troncales de la región prominente del folículo piloso y causa una hiperplasia transitoria en el epitelio interfolicular. Además, no produce daño en el tejido y no induce la formación de tumores cutáneos a largo plazo. Asimismo, se ha demostrado que es capaz de estimular el crecimiento del pelo durante la fase de telogén o reposo y la regeneración tisular de lesiones producidas por quemadura. Se ha caracterizado también la alteración del patrón de expresión génica global de la piel en respuesta a la producción de ROS inducida por el TF, activando significativamente la expresión de genes de la familia 2 subfamilia c de la prolactina (proliferinas), particularmente *Prl2c3*. Esta modulación transcripcional está asociada a la activación de la señalización mediada por c-Src y al incremento de expresión y translocación nuclear en la epidermis de la proteína *Prl2c3*.

En conjunto, estos resultados demuestran que la producción endógena de ROS es capaz de regular *in vivo* la actividad de las células troncales adultas, así como distintos procesos dependientes del mantenimiento de la homeostasis tisular. Asimismo, la aproximación experimental utilizada en este trabajo ha permitido identificar la implicación de c-Src y la proteína *Prl2c3* en un mecanismo de regulación de la homeostasis cutánea no descrito hasta ahora, que podría ser considerado como potencial diana terapéutica en biomedicina.

Summary

Reactive Oxygen Species (ROS) are continuously produced by different cellular mechanisms and they have been traditionally linked to pathological conditions and aging. However, several observations suggest that low levels of ROS can as well regulate cellular processes such as proliferation, differentiation, programmed cell death or cytoskeleton remodeling. The importance of this regulatory mechanism *in vivo* is still largely unknown.

Photodynamic treatment (PT) induces endogenous ROS production through the combination of three elements: a photosensitizer (PS) compound that is accumulated in target cells, light and oxygen. The clinical application of this procedure is based on the induction of selective tumor cell death as a result of the oxidative stress. High levels of ROS are produced by tumoral tissues due to the intracellular accumulation of high levels of PS. However, low levels of ROS produced in by normal cells in response to PT can have a stimulatory effect.

Here we have used a PT with m-ALA and red light to analyze the effect of endogenous ROS production *in vivo* in the mouse model. Our results demonstrate that ROS production in the skin induces proliferation in the hair follicle bulge stem cell niche and a transient hyperplasia in the interfollicular epithelium. The tissue was not damaged by the treatment and long-term tumor induction was not observed. Furthermore, we have demonstrated that a transient endogenous ROS production induced by PT actively regulates skin homeostasis, activating hair growth during telogen resting phase and promoting tissue regeneration after burn injury. We have also characterized changes in global gene expression patterns in the skin linked to transient ROS production. In particular, we found a significant transcriptional activation of prolactin family 2 subfamily c gene members (proliferins), specially Prl2c3. These transcriptional changes were associated to the activation of c Src-mediated signaling, and to an increase in the expression and nuclear translocation of Prl2c3 protein in the epidermis.

All together, our results demonstrate that an endogenous ROS production *in vivo* can regulate adult stem cell function and tissue homeostasis-dependent processes. Moreover, our experimental approach allowed the identification of a new mechanism of skin homeostasis regulation, involving the activity of c-Src and Prl2c3 proteins. This novel regulatory mechanism is a potential therapeutic target in biomedicine.

Índice

I. Introducción.....	1
1.1. Células troncales: concepto, clasificación e implicaciones	2
1.2. La piel	5
1.2.1. El folículo piloso	7
1.2.2. El ciclo del pelo	9
1.2.3. Células troncales epidérmicas.....	11
1.3. Especies reactivas de oxígeno.....	14
1.4. Fotogeneración de especies reactivas de oxígeno.....	18
II. Hipótesis y objetivos	23
III. Materiales y Métodos	26
3.1. Animales de experimentación	27
3.2. Identificación de células quiescentes en tejidos adultos	27
3.3. Aislamiento de la piel de la cola y preparación de montajes <i>in toto</i>	27
3.4. Tratamiento fotodinámico con m-ALA y detección de PpIX	28
3.5. Detección de ROS en la piel	30
3.5.1. Detección de ROS <i>in vivo</i>	30
3.5.2. Localización de ROS <i>ex vivo</i>	30
3.6. Modelo de quemadura en piel de ratón	31
3.7. Procesamiento histológico.....	32
3.8. Métodos inmunológicos y enzimáticos.....	32
3.8.1. Anticuerpos.....	32
3.8.2. Inmunofluorescencia en montajes <i>in toto</i> de epidermis de la cola	34
3.8.3. Inmunofluorescencia en cortes de tejido incluidos en parafina	34
3.8.4. Inmunohistoquímica en cortes de tejido incluidos en parafina.....	35
3.8.5. Extracción de proteínas y análisis de expresión mediante inmunoblot	35
3.8.6. Ensayo TUNEL	36
3.9. Extracción de ARN y análisis de expresión génica a nivel transcripcional	36
3.9.1. Extracción de ARN.....	36
3.9.2. Análisis de expresión génica a gran escala.....	37

3.9.3. Análisis de expresión génica por retrotranscripción de ARNm y PCR cuantitativa en tiempo real.....	37
3.10. Evaluación de las muestras y análisis estadísticos	38
IV. Resultados	40
4.1. El tratamiento fotodinámico con m-ALA induce la acumulación de PpIX y posterior producción de ROS <i>in situ</i> en la piel	41
4.2. La fotogeneración de ROS induce una proliferación transitoria en el nicho de células troncales de la región prominente del folículo piloso	43
4.3. La producción de ROS inducida por el tratamiento fotodinámico promueve la hiperplasia transitoria del epitelio interfolicular	48
4.4. La producción de ROS inducida por el tratamiento fotodinámico no produce daño genómico en la piel y no promueve la formación de tumores cutáneos a largo plazo.....	48
4.5. La activación del nicho de células troncales del folículo piloso mediante la fotogeneración de ROS promueve el crecimiento del pelo	52
4.6. La producción endógena de ROS inducida por el tratamiento fotodinámico promueve el proceso de regeneración tisular en la piel.....	54
4.7. La estimulación de la piel en respuesta a la fotogeneración de ROS está asociada a la activación de c-Src, pero no a la acumulación citoplasmática y translocación nuclear de β -catenina	57
4.8. La generación transitoria de ROS debida al tratamiento fotodinámico induce un cambio definido en el patrón de expresión génica global de la piel.....	60
4.9. La generación de ROS promovida por el tratamiento fotodinámico induce transitoriamente la translocación nuclear de Prl2c3 en las células de la epidermis .	63
V. Discusión.....	65
IV. Conclusiones.....	78
VII. Bibliografía.....	80

I. Introducción

1.1. Células troncales: concepto, clasificación e implicaciones

Las células troncales presentan dos propiedades esenciales: el potencial de diferenciación para dar lugar a uno o más tipos celulares y la capacidad de auto-renovación o regeneración, originando nuevas células con las mismas características. La clasificación de las células troncales puede llevarse a cabo en función de diferentes criterios, que a su vez se encuentran relacionados. Así, en mamíferos, dependiendo de su origen se distinguen dos tipos básicos: embrionarias y adultas. La actividad de las células troncales embrionarias tiene lugar durante un corto y preciso período de tiempo durante el desarrollo del embrión, originando todas las capas germinales embrionarias que posteriormente darán lugar a los tejidos del organismo adulto. A su vez, el mantenimiento tisular y la capacidad de regeneración de los tejidos en el individuo adulto dependerán de la actividad de las células troncales adultas. Por otra parte, atendiendo a su potencial de diferenciación, las células troncales pueden ser clasificadas en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes (Fuchs y col., 2004; García-Olmo y col., 2008). El máximo potencial de diferenciación corresponde a las células troncales totipotentes y pluripotentes, que existen exclusivamente en el embrión, mientras que las multipotentes y unipotentes se encuentran tanto en el embrión como en el adulto.

Las células troncales totipotentes pueden diferenciarse para dar lugar a todos los tipos celulares necesarios para generar un organismo completo, tanto los componentes embrionarios —que incluyen las tres hojas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo) y el linaje germinal— como los extraembrionarios —que darán lugar a estructuras como el saco vitelino o la placenta. Este tipo celular engloba al huevo fecundado resultante de la fusión del óvulo y el espermatozoide, así como a las células resultantes de sus primeras divisiones, hasta el estadio de mórula. Las células troncales pluripotentes no pueden originar un organismo completo, aunque sí tienen capacidad de diferenciarse para dar lugar a células de todas las capas embrionarias. Estas células componen la masa celular interna del blastocisto que, durante la gastrulación y organogénesis, originan todos los tejidos y órganos del individuo. Las células troncales embrionarias unipotentes y multipotentes se

consideran específicas de tejido, siendo los linajes de los tejidos extraembrionarios los primeros que se establecen en el embrión (Yamanaka y Ralston, 2010).

Las células troncales adultas residen en los tejidos adultos y pueden ser unipotentes o multipotentes, esto es, tienen capacidad de diferenciarse para dar lugar respectivamente a uno o más tipos celulares específicos de tejido, por lo que son responsables de la regeneración tisular del organismo. Estas células se localizan en lugares específicos dentro del tejido, denominados nichos (Fuchs y col., 2004; García-Olmo y col., 2008). El nicho es un elemento fundamental en la regulación funcional de las células troncales, puesto que la actividad de proliferación y diferenciación de las mismas está regulada en gran medida por las señales moleculares emanadas de las células que lo conforman (Rizvi y Wong, 2005; Fuchs, 2009; Goldstein y Horsley, 2012). La mayoría de las células troncales adultas desarrollan su actividad a lo largo de toda la vida del organismo. Sin embargo, a excepción de las células troncales de la médula ósea, su identificación y la caracterización funcional de sus nichos resultan metodológicamente complejas. Esto se debe, en gran medida, a la ausencia de marcadores específicos de estos tipos celulares, así como a la pequeña fracción que representan las células troncales adultas con respecto a la población celular total de un determinado tejido.

Existe un interés creciente por las células troncales embrionarias y adultas, en la sociedad en general y en el campo de la biomedicina en particular. Los esfuerzos dirigidos al conocimiento de su biología han sido impulsados por las expectativas que ofrece su uso potencial como una herramienta clave en medicina regenerativa. Su utilización podría conducir al desarrollo *in vitro* de tejidos e incluso órganos a partir del propio paciente, solventando el problema del rechazo. Asimismo, se persigue la identificación de poblaciones celulares como posibles dianas terapéuticas en los procesos de cáncer y envejecimiento, ambos etiológicamente relacionados con alteraciones en la función de las células troncales (Mimeault y Batra, 2010). También se ha demostrado a partir de diversos tipos tumorales que tan solo una pequeña fracción celular dentro del tejido afectado es capaz de iniciar la formación de nuevos tumores tras un trasplante experimental, tratándose de células que comparten numerosas características con las células troncales adultas del tejido de origen. Esto ha

dado lugar al concepto de célula troncal cancerígena, que se entiende como el origen y responsable de la recidiva de muchos tipos de cáncer y motiva el replanteamiento de las estrategias futuras en la lucha contra este conjunto de enfermedades (Jordan, 2009, Morrison y col., 2011).

Los primeros pasos en el campo de la reprogramación nuclear llevados a cabo por Gurdon desde mediados del siglo XX utilizando el modelo de *Xenopus* (Gurdon, 2013) constituyen uno de los hitos que han culminado en el desarrollo de la tecnología de las células pluripotentes inducidas (*induced Pluripotent Stem cells*, iPS) durante la última década. Este hallazgo, protagonizado por el grupo de Yamanaka, representa la posibilidad de revertir las células somáticas de un individuo adulto al estado de pluripotencialidad característico de las células troncales embrionarias, a través de la reactivación de la expresión de un reducido y definido número de genes. Estos resultados —que les valieron el premio Nobel en Fisiología o Medicina en 2012 a ambos científicos— no solo han abierto todo un abanico de posibilidades para el desarrollo de nuevas terapias que incorporen esta tecnología (Yamanaka, 2012), sino que además han puesto de manifiesto la relevancia del potencial uso terapéutico de las células troncales de distintos orígenes.

Sin embargo, teniendo en cuenta el conflicto ético que supone el uso de las células troncales embrionarias, junto con el desconocimiento actual de las consecuencias funcionales a largo plazo de la utilización de células iPS, el uso de células troncales adultas se muestra como una alternativa de gran interés. Indudablemente, la adecuada aplicación terapéutica de estas células en cualquiera de sus variantes curativa o regenerativa requiere el máximo conocimiento de su biología fundamental y sus mecanismos de regulación, así como los de su entorno o nicho, determinante último de sus características únicas.

Resulta, por tanto, decisivo encontrar reservorios de células troncales adultas fácilmente accesibles para que este conocimiento pueda ser llevado a la práctica terapéutica de forma fructífera. La capacidad de renovación constante de la mayoría de los tejidos epiteliales ha fundamentado la búsqueda y caracterización de nichos de células troncales adultas en distintas localizaciones, como las criptas intestinales, la

yema del extremo terminal de los conductos de la glándula mamaria, el limbo corneal o el folículo piloso (Blanpain y col., 2007).

La piel reúne una serie de características que la convierten en una diana crucial para este fin, comenzando por su elevada extensión y accesibilidad, que superan a las de ningún otro órgano del cuerpo. Además, la piel alberga reservorios de células troncales adultas pertenecientes a distintos linajes —no solo epiteliales, sino también hematopoyéticas y neurales— y constituye un órgano privilegiado desde el punto de vista inmunológico, particularmente a nivel de los folículos pilosos, que presentan una aparente ausencia de expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de tipo I y un bajo número de células del sistema inmune. Todo esto supone que las células troncales derivadas de la piel podrían ser utilizadas como donantes universales (Shi y col., 2006). En conjunto, todos estos factores sugieren que la piel resulta un órgano idóneo para analizar de forma efectiva la biología funcional de las células troncales adultas y diseñar nuevos abordajes dirigidos a su futura aplicación en distintas terapias (Mimeault y Batra, 2010).

1.2. La piel

La piel es el órgano con mayor superficie del cuerpo ($1,5\text{-}2\text{ m}^2$), representa alrededor del 16% del peso corporal y constituye la principal barrera frente a agentes externos. Se compone esencialmente de dos capas, la epidermis y la dermis, bajo las cuales se encuentra la hipodermis o tejido subcutáneo. Además, la piel posee una serie de apéndices asociados como folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas.

La epidermis es la capa más externa de la piel y está formada esencialmente por queratinocitos, que constituyen el tipo celular característico y mayoritario, aunque contiene también otros tipos celulares como melanocitos —implicados en la pigmentación—, células de Merkel —relacionadas con la percepción sensorial— y células de Langerhans —que forman parte del sistema inmune, suelen situarse en la capas suprabasales y son presentadoras de antígenos. Morfológicamente, la epidermis está constituida por diferentes capas o estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo que, en conjunto, forman un epitelio estratificado queratinizado. La proliferación tiene lugar eventualmente en la capa basal, desde donde los queratinocitos se desplazan

hacia capas más externas a medida que se diferencian (García-Olmo y col., 2008) (Fig. 1).

El proceso de diferenciación en la epidermis implica cambios morfológicos y moleculares a nivel espacial y temporal. Así, los queratinocitos de la capa basal o estrato germinativo, en contacto con la membrana basal, expresan queratina 5 y queratina 14 (K5 y K14, respectivamente). La transición a la capa suprabasal (estrato espinoso) va acompañada de pérdida de adhesión a la membrana basal, disminución de expresión de K5 y K14 y sobreexpresión de K1 y K10. En la capa suprabasal, los queratinocitos activan un proceso de diferenciación terminal que conlleva la expresión sucesiva de marcadores característicos de los distintos estratos (Forni y col., 2012). En el estrato granuloso las células acumulan en su interior gránulos de queratohialina (compuestos por profilagrina) y finalmente pasan a formar la capa córnea, caracterizada por la expresión de loricrina y periplaquina entre otras proteínas (Fig. 1). Estudios recientes sugieren que, aunque el programa de diferenciación terminal requiere el bloqueo de la citocinesis, el curso del ciclo celular no se detiene, de modo que los queratinocitos continúan replicando su ADN y creciendo sin experimentar división celular (proceso conocido como endorreplicación) a medida que se diferencian (Gandarillas, 2012). En la piel de ratón, el recambio completo de la epidermis dura unos 10 a 14 días (Alonso y Fuchs, 2003), mientras que en la epidermis humana ocurre más lentamente, ocupando entre 2 y 4 semanas (Blanpain y col., 2007; Goldstein y Horsley, 2012).

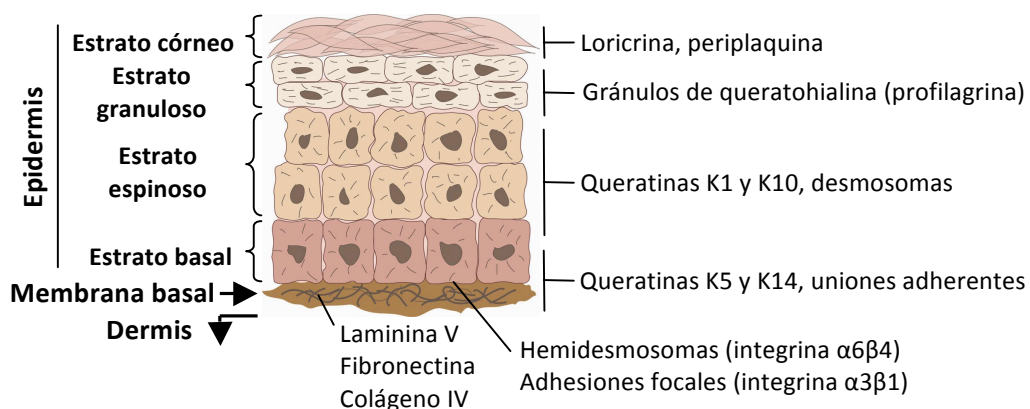


Fig. 1 | Organización histológica de la epidermis. Las células del estrato basal, con potencialidad mitótica y ancladas a la membrana basal subyacente, originan nuevas células, que experimentan un proceso de diferenciación terminal a medida que atraviesan los estratos espinoso, granuloso y córneo. En la columna de la derecha se indican algunos de los marcadores moleculares de dichos estratos.

La epidermis queda anclada a través de una membrana basal a la dermis, sobre la cual se sustenta (**Fig. 1**). El tipo celular esencial de la dermis es el fibroblasto, responsable de la producción y mantenimiento de los elementos estructurales de la piel, incluyendo colágeno y elastina, que se combinan con componentes no fibrosos para formar la matriz extracelular rica en glucosaminoglicanos. Aunque en menor proporción, la dermis contiene también otros tipos celulares que incluyen macrófagos —células con capacidad fagocítica y presentadoras de antígenos—, linfocitos —productores de anticuerpos—, mastocitos —que contienen gránulos de histamina y heparina— y, eventualmente, agrupaciones de células adiposas.

Bajo la dermis se encuentra la hipodermis, compuesta mayoritariamente por adipocitos en algunas regiones del cuerpo y anclada laxamente al tejido conjuntivo más profundo, o bien al periostio de las prominencias óseas.

1.2.1. El folículo piloso

Los folículos pilosos son anejos cutáneos originados a partir del epitelio epidérmico durante el desarrollo embrionario. Mientras que el epitelio interfolicular se regenera de forma continua, el folículo piloso experimenta ciclos sucesivos de renovación que comprenden las fases de crecimiento (anagén), regresión (catagén) y reposo (telogén) ([Hardy, 1992](#); [Fuchs, 2007](#); [Solanas y Benitah, 2013](#)). La unidad pilosebácea se compone de un folículo piloso asociado a una glándula sebácea y un músculo liso piloerector. La contracción involuntaria de este último provoca la erección del pelo e induce a la glándula sebácea a verter su secreción, favoreciendo la función de la piel como barrera térmica. Morfológicamente, el folículo piloso presenta principalmente tres regiones diferenciadas: el infundíbulo, que abarca la región comprendida desde la superficie hasta la altura en la que desembocan las glándulas sebáceas; la zona de unión y con el istmo, que se suceden entre el infundíbulo y el punto de inserción del músculo piloerector; y el segmento inferior, que limita con el istmo y se extiende hasta el extremo más profundo del folículo ([Solanas y Benitah, 2013](#)) (**Fig. 2**). La zona situada inmediatamente bajo la glándula sebácea y el lugar de inserción del músculo piloerector se conoce como región prominente (*bulge*) del folículo piloso y constituye un nicho principal de células troncales epidérmicas. Aunque

la región prominente debe su nombre al aspecto característico que presenta durante la fase de anagén (**Fig. 2**), las células troncales quiescentes se alojan también en dicha localización en el folículo piloso en telogén, a pesar de no observarse una protuberancia lateral. Por tanto, la región prominente hace referencia al compartimento ocupado mayoritariamente por las células troncales foliculares y no a una estructura tisular definida (Braun y col., 2003).

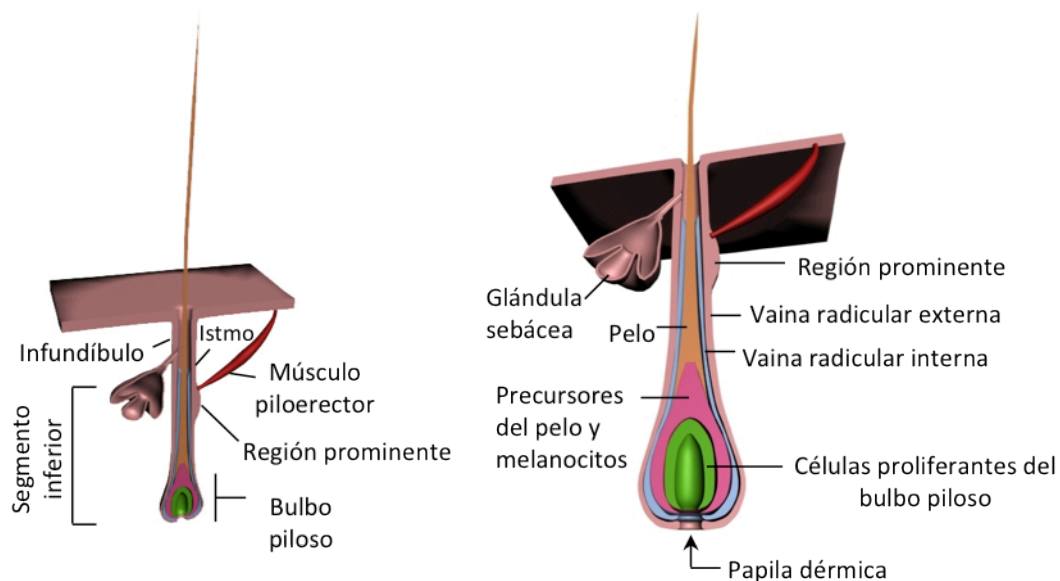


Fig. 2 | Estructura del folículo piloso. El infundíbulo, el istmo, las glándulas sebáceas y la región prominente (abultamiento de la vaina radicular externa a nivel de inserción del músculo piloerector) componen la porción permanente del folículo piloso. El segmento inferior se extiende en profundidad y corresponde con la porción cíclica, sometida a sucesivos ciclos de crecimiento y regresión. El bulbo piloso, dilatación terminal del folículo que engloba a la papila dérmica, contiene las células de la matriz, que proliferan y se diferencian formando el pelo y la vaina radicular interna. Estas células se originan a partir de las células troncales de la región prominente.

En cuanto a su organización, el folículo piloso maduro (en la fase de crecimiento o anagén) está formado por capas concéntricas de células epiteliales dispuestas alrededor del pelo propiamente dicho (**Fig. 2**). Situado en la región más profunda, el bulbo piloso se compone de células que proliferan con rapidez envolviendo a la papila dérmica mesenquimática. Estas células epiteliales dan lugar a poblaciones celulares que experimentan diferentes procesos de diferenciación terminal para formar el pelo y la vaina interna de la raíz, que lo rodea inmediatamente. Más externamente se encuentra la vaina externa de la raíz, que es continua con el epitelio interfolicular y las glándulas sebáceas, contiene la región prominente y se extiende en profundidad

recubriendo al bulbo. El folículo piloso está delimitado por una gruesa lámina basal que lo separa de la dermis y en la que se inserta el músculo erector del pelo. Los folículos en crecimiento activo contienen también melanocitos que migran desde las crestas neurales e invaden la epidermis, aportando pigmentación al pelo en desarrollo (Tumbar y Fuchs, 2004).

1.2.2. El ciclo del pelo

El ciclo del pelo afecta exclusivamente a la parte más profunda del folículo, denominada porción cíclica, mientras que la porción permanente se mantiene inalterada durante los sucesivos ciclos de crecimiento y regresión. De este modo, durante la fase de telogén el folículo piloso queda reducido al infundíbulo, la glándula sebácea, la región prominente y la papila dérmica en posición adyacente (Tumbar y Fuchs, 2004).

Tomando arbitrariamente la etapa de telogén como punto de partida del ciclo folicular (**Fig. 3**) y de acuerdo con la hipótesis de activación de la región prominente (Sun y col., 1991), una secuencia definida de señales moleculares originadas en la papila dérmica durante la transición telogén/anagén inducen la división asimétrica de las células troncales localizadas en la base de la porción permanente. Esto da lugar a nuevas células troncales y a una población celular con capacidad de proliferar rápidamente, que recibe el nombre de células de amplificación en tránsito (*transit amplifying cells*, en adelante células TA). Estas últimas, destinadas a diferenciarse en distintos tipos celulares, migran para formar un nuevo bulbo piloso que engloba a la papila dérmica, dando lugar a la porción cíclica a medida que el folículo piloso crece en profundidad. Hacia la mitad de la fase de anagén, las células troncales que residen en la región prominente abandonan nuevamente el ciclo celular para retomar su estado de quiescencia. Finalmente, cuando el potencial de proliferación de la progenie celular se agota, finaliza la etapa de crecimiento y se produce la entrada en catagén, iniciándose la degradación de la zona inferior del folículo piloso. Como consecuencia, la papila dérmica se retrae hasta la base de la región prominente, donde permanece durante la fase de telogén. Esta proximidad entre la región prominente y la papila dérmica es crucial para el establecimiento de las interacciones epitelio-mesénquima que desencadenarán una nueva entrada en anagén (Schneider y col., 2009).

A diferencia de los que ocurre en humanos, el ciclo del pelo tiene lugar de forma sincronizada en la piel dorsal del ratón. Así, la primera telogén postnatal es corta, extendiéndose solo durante un día o dos (entre los 19 y 21 días de edad), mientras que la segunda telogén comienza alrededor de los 42 días de edad y se prolonga durante más de dos semanas (Müller-Röver y col., 2001).

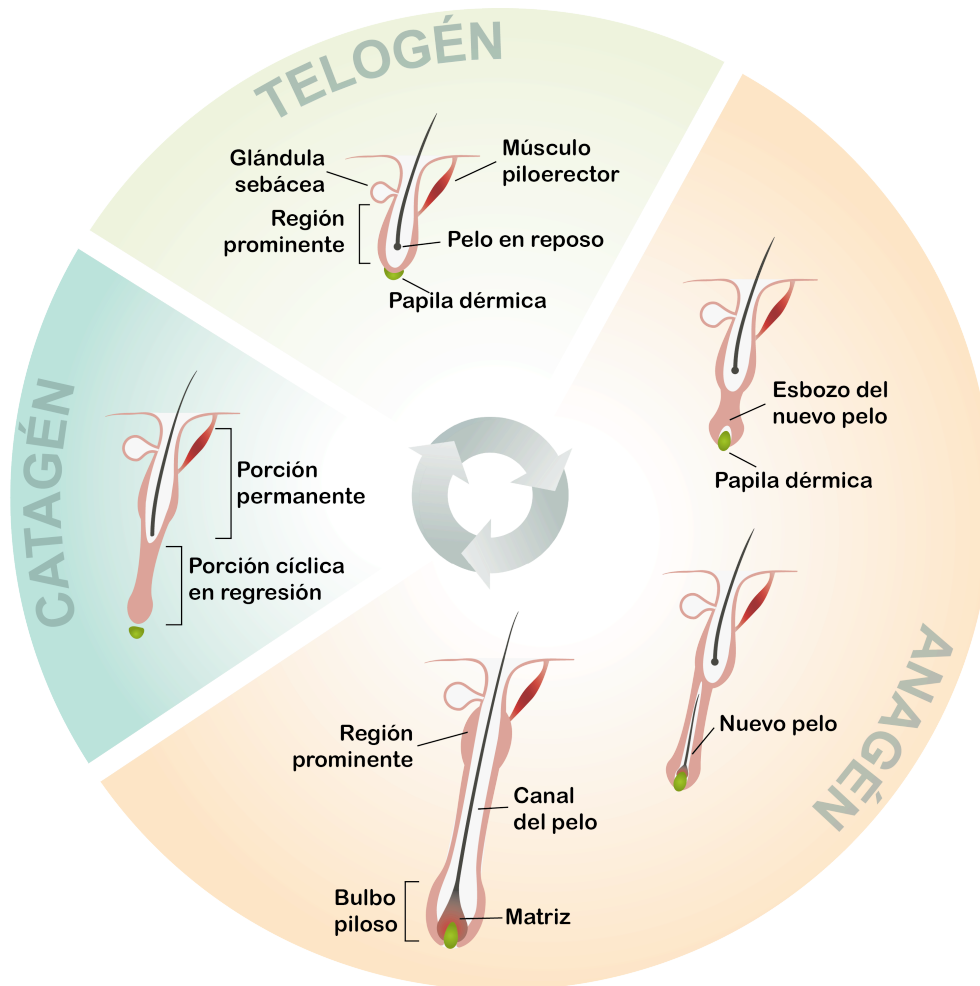


Fig. 3 | Ciclo del folículo piloso. Durante la fase de anagén, las células del bulbo piloso proliferan y se diferencian, formando la porción cíclica del folículo y dando lugar al pelo. En catagén se degradan los dos tercios inferiores del folículo piloso y, durante la etapa de reposo o telogén, persiste solo la región permanente (el tercio superior junto con la papila dérmica subyacente). Señales procedentes de la papila estimulan a las células de la región prominente a dividirse y diferenciarse, desencadenando una nueva etapa de crecimiento y diferenciación.

La alternancia entre los distintos estados que atraviesa el folículo piloso durante las fases de crecimiento y regresión a lo largo de los sucesivos ciclos, así como la regulación dinámica entre la quiescencia y la activación del ciclo celular en las células troncales localizadas en los distintos compartimentos dentro del propio folículo, tiene

lugar gracias a la actividad coordinada de diferentes cascadas de señalización, entre las que destacan principalmente Wnt, Shh, Notch y BMP/TGF- β , en combinación con numerosos factores de transcripción, como son Lhx2, NFATc1, TCF3/4, TCF3/ β -catenina o Runx1 (Rizvi y Wong, 2005; Goldstein y Horsley, 2012). De forma general, el mantenimiento de la quiescencia por parte de las células troncales de la región prominente viene definido por las señales inhibitorias generadas mediante la activación de la ruta BMP, acompañada por el silenciamiento de las vías Wnt y Shh. Por su parte, la activación del ciclo celular en las células que ocupan el bulbo piloso responde a la activación de las rutas Wnt y Shh, manteniéndose inactiva la señalización BMP (Goldstein y Horsley, 2012). La sensibilidad para responder a estas señales moleculares depende también de otros factores, como los ritmos circadianos (Solanas y Benitah, 2013).

1.2.3. Células troncales epidérmicas

La mayoría de epitelios necesitan reemplazar constantemente las células que resultan dañadas o mueren a lo largo de la vida del animal. El proceso fisiológico por el cual se reponen las células que forman el tejido en los órganos que experimentan renovación celular constante, como es el caso de la piel, se denomina homeostasis y es crítico para el mantenimiento de los tejidos adultos (Blanpain y Fuchs, 2009). El mantenimiento de la homeostasis tisular de los epitelios tiene lugar gracias a la presencia y actividad de células troncales multipotentes y unipotentes. Una vez activadas, las células troncales epiteliales pueden generar una progenie de células TA, caracterizadas por su alta tasa de proliferación. En su ambiente normal, las células TA se dividen activamente durante un período de tiempo limitado, expandiendo la población celular que posteriormente se diferenciará en los linajes celulares propios del tejido (Blanpain y col., 2007).

La división celular en la epidermis se produce eventualmente en el estrato basal. A su vez, algunas de las células originadas activan periódicamente su programa de diferenciación terminal, por el cual los queratinocitos se desplazan hacia la superficie contribuyendo a la renovación de las capas suprabasales que forman parte del epitelio estratificado (Blanpain y Fuchs, 2009). Las células troncales epidérmicas son, por tanto, responsables del mantenimiento de la homeostasis en la epidermis, así como de la

reparación del tejido tras la generación de heridas. Existen tres poblaciones de células troncales epidérmicas que residen en diferentes localizaciones: la capa basal del epitelio interfolicular, las glándulas sebáceas y la región prominente del folículo piloso (Mitsiadis y col., 2007; Pincelli y Marconi, 2010). El área del folículo piloso que alberga la mayor concentración de células troncales epidérmicas, morfológicamente indiferenciadas y eminentemente quiescentes, es la región prominente (Ohyama, 2007).

Durante el recambio fisiológico del tejido, el epitelio interfolicular, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas se mantienen como compartimentos independientes, renovándose cada uno a partir de su propia población de células troncales (Pincelli y Marconi, 2010; Page y col., 2013). No obstante, cuando la homeostasis tisular es alterada —ya sea en condiciones patológicas o bien como consecuencia de agresiones externas—, cualquiera de estas poblaciones de células troncales es capaz de regenerar los tres tipos de estructuras (Pincelli y Marconi, 2010). En particular, el carácter multipotente de las células de la región prominente las hace susceptibles de ser reclutadas para contribuir a la reparación del epitelio interfolicular en respuesta a estímulos como la generación de heridas (Cotsarelis, 2006) o el tratamiento con inductores de la proliferación celular como el éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), inductor de la proliferación celular (Braun y col., 2003).

Dos características esenciales de las células troncales epidérmicas —su alta capacidad de proliferación en respuesta a estímulos y su quiescencia en situación de reposo— constituyen la base experimental de las aproximaciones metodológicas más comúnmente utilizadas para la identificación de esta población celular dentro del tejido: el análisis de clonogenicidad y la incorporación de análogos de nucleótido marcados (Terskikh y col., 2012). Además, se han identificado distintos marcadores moleculares que caracterizan a las diferentes poblaciones de células troncales residentes en la piel (Jaks y col., 2010; Solanas y Benitah, 2013).

En primer lugar, el análisis de clonogenicidad se basa en la capacidad de las células troncales epidérmicas para formar colonias estables (holoclones) en cultivos *in vitro*, mientras que las células TA y cualquier otra población celular obtenida a partir

del tejido carecen de la suficiente capacidad de auto-renovación, por lo que forman clones abortivos. Está ampliamente aceptado que las células capaces de dar lugar a holoclones *in vitro* corresponden a células troncales *in vivo* (Alonso y Fuchs, 2003; Tersikh y col., 2012).

En segundo lugar, el método más fiable y extendido para identificar las células troncales adultas, y en particular las células troncales epidérmicas, se apoya en su baja frecuencia de proliferación con respecto a las restantes poblaciones celulares del tejido (Tersikh y col., 2012). Las células en división pueden marcarse mediante la administración seriada de análogos de nucleótido, como timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ timidina) o 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), de tal forma que los nucleótidos marcados son incorporados a la molécula de ADN en los procesos de replicación y reparación (Bickenbach, 1981; Cotsarelis y col., 1990). La administración del análogo de nucleótido a los animales en edad postnatal muy temprana, cuyos tejidos y órganos se encuentran en una fase activa de proliferación y diferenciación, favorece la incorporación de la marca por la mayoría de las células del organismo durante el proceso de replicación del ADN. El marcaje se pierde gradualmente a lo largo del tiempo en la mayoría de los núcleos celulares como consecuencia de las sucesivas rondas de replicación. Sin embargo, transcurridos varios meses, solo aquellas células con baja tasa de proliferación permanecen marcadas en el tejido adulto, por lo que se denominan células que retienen la marca (*Label Retaining Cells*, LRC) y se corresponden con las células troncales adultas (Bickenbach, 1981; Cotsarelis y col., 1990; Lavker y Sun, 2000; Braun y col., 2003). En la epidermis adulta en reposo, que contiene mayoritariamente folículos pilosos en telogén, la localización predominante de las LRC es la región prominente del folículo piloso (Cotsarelis y col., 1990).

En tercer lugar, pese a que el principal obstáculo para la identificación precisa de las células troncales en el organismo adulto es la carencia de marcadores moleculares específicos, dichas células presentan un fenotipo característico que incluye la expresión de un conjunto de marcadores enriquecidos. En la piel del ratón en particular, dentro de la unidad pilosebácea coexisten distintas sub-poblaciones de células troncales que expresan combinaciones definidas de marcadores. La expresión

de queratina 15 (K15) destaca como uno de los marcadores más característicos del compartimento principal de la región prominente (Liu y col., 2003; Goldstein y Horsley, 2012). Otras moléculas que definen de forma secuencial la distribución espacial de distintas poblaciones de células troncales en el folículo son Sca1 en el infundíbulo, Blimp1 en las glándulas sebáceas, Lrig1, MTS24 y Lgr6 a la altura del istmo, Gli1 en la parte superior de la región prominente, CD34 en la región prominente y Lgr5 en la parte inferior de la región prominente y la zona germinal del bulbo (Pincelli y Marconi, 2010; Jaks y col., 2010; Goldstein y Horsley, 2012; Page y col., 2013; Solanas y Benitah, 2013). No obstante, se desconoce si el compartimento de células troncales del folículo funciona como una población global o si consiste en sub-poblaciones independientes o inter-relacionadas según una organización funcional y jerárquica (Goldstein y Horsley, 2012).

1.3. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) se generan inevitablemente como subproductos de las reacciones químicas implicadas en el metabolismo aerobio. La molécula de oxígeno (O_2), que presenta una estructura de triplete (3O_2), es relativamente estable y poco reactiva. Sin embargo, las ROS derivadas de ella se caracterizan por su elevada capacidad para reaccionar de forma rápida y descontrolada con otros compuestos de su entorno, pudiendo llegar incluso a comprometer la viabilidad celular. Estas especies químicas comprenden fundamentalmente el oxígeno singlete (1O_2), el anión superóxido ($\bullet O_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$), aunque existen otras relacionadas, como el peroxinitrito y el hipoclorito, que contienen otros elementos (Bartosz, 2009).

La mitocondria constituye la fuente predominante de ROS en la célula, principalmente a través del complejo III (complejo citocromo b-c1) de la cadena respiratoria, que por transferencia de un electrón al oxígeno molecular genera el radical anión superóxido, el cual es posteriormente dismutado a peróxido de hidrógeno en una reacción catalizada por las superóxido dismutasas mitocondriales (Giannoni y col., 2010; Corcoran y Cotter, 2013). Existen otros sistemas celulares de producción de ROS, siendo el primero que se describió la actividad de las NADPH oxidasas (NOX), una familia de proteínas transmembrana que catalizan la reducción

del oxígeno dependiente de NADPH para formar superóxido, sistema involucrado en la generación de ROS en respuesta a factores de crecimiento solubles. Adicionalmente, ciclooxigenasas, lipoxigenasas, citocromo P450 y xantina oxidasa contribuyen a la producción de ROS en la célula (Gianni y col., 2008; Giannoni y col., 2010; Corcoran y Cotter, 2013).

El estrés oxidativo generado por la acumulación de ROS intracelular es una causa fundamental de toxicidad en los tejidos y se encuentra asociado a numerosos procesos patológicos en humanos, incluyendo distintos tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica), alteraciones psiquiátricas (esquizofrenia, trastorno bipolar) y enfermedades cardiovasculares (derrame cerebral, infarto de miocardio) (Valko y col., 2007; Kovacic y Somanathan, 2012; Pandya y col., 2013). Por otra parte, el exceso de ROS promueve la senescencia celular y se ha señalado que la producción de radicales libres y el estrés oxidativo generado en los tejidos a lo largo de la vida del organismo contribuyen al proceso multifactorial del envejecimiento (Valko y col., 2007; Pérez y col., 2009).

En este contexto, es necesaria una regulación altamente controlada de los niveles de ROS celulares, que permita mantener un equilibrio entre los sistemas de generación y eliminación de ROS. Para contrarrestar el exceso de ROS producidas, los organismos aerobios han desarrollado potentes mecanismos de detoxificación que juegan un importante papel anti-oxidante. Así, las células de los mamíferos son capaces de convertir químicamente las ROS para liberar finalmente H₂O y O₂, que no resultan perjudiciales. Entre los numerosos sistemas enzimáticos implicados en esta actividad, se incluyen las superóxido dismutasas, la catalasa, la glutatión peroxidasa y las peroxirredoxinas (Shi y col., 2012). De hecho, durante la evolución no solamente se han desarrollado sistemas dirigidos a contrarrestar la generación excesiva de ROS, sino que incluso han surgido estrategias para utilizar las ROS en beneficio del propio organismo, como es el caso del mecanismo de eliminación de patógenos y partículas extrañas por parte de las células fagocíticas (Shi y col., 2012).

Sin embargo, más allá de ser exclusivamente consideradas como desencadenantes de situaciones patológicas, existen numerosas observaciones que

indican un papel esencial de las ROS en numerosos procesos de señalización intracelular. Así, en condiciones fisiológicas normales, niveles bajos a moderados de ROS intervienen en la regulación del desarrollo de funciones celulares fundamentales como proliferación, diferenciación, migración o tráfico intracelular de vesículas (Bartosz, 2009; Shi y col., 2012). El principal mecanismo por el cual las ROS juegan este papel como moléculas señalizadoras es la modificación de otras moléculas diana susceptibles de ser oxidadas, entre las que destaca la familia de proteínas tirosina-fosfatasa (*Protein Tyrosine Phosphatases*, PTP), las proteínas G, algunos canales iónicos, ciertos factores de transcripción y distintos tipos de quinasas (Bartosz, 2009).

La proteína c-Src, miembro prototípico de la familia Src de proteína tirosina-quinasa (*Protein Tyrosine Kinases*, PTK) de tipo no receptor asociadas a membrana (*Src family of protein tyrosine kinases*, SFK), es una de las principales moléculas susceptibles de ser reguladas por ROS (Corcoran y Cotter, 2013). Su actividad depende en gran medida de la regulación por fosforilación/defosforilación en dos residuos de tirosina con características opuestas. La fosforilación del residuo Tyr527, sitio de regulación negativa situado en la cola C-terminal, induce una conformación inactiva de la proteína. Tras la defosforilación de esta posición, se produce un cambio conformacional que favorece la auto-fosforilación en el residuo Tyr416, esencial para alcanzar la máxima actividad quinasa (Chiarugi, 2008). La regulación de c-Src vía redox afecta a este circuito de fosforilación/defosforilación, contribuyendo a su activación mediante dos vías sinérgicas. Por una parte, las ROS inducen la oxidación reversible de residuos de cisteína críticos, promoviendo la formación de puentes disulfuro intra-moleculares que favorecen la conformación necesaria para la auto-fosforilación activante en la posición Tyr416 (Chiarugi, 2008). Paralelamente, la oxidación de un residuo de cisteína conservado en el sitio activo de las PTP conduce, en este caso, a su inactivación enzimática, quedando bloqueada su función antagonista a la señalización tirosina-quinasa (Chiarugi y Cirri, 2003; Chiarugi, 2008).

Las SFK no son las únicas PTK que responden a una regulación redox. La familia de receptores tirosina-quinasa (*Receptor Tyrosine Kinases*, RTK) asociados a la

membrana contiene miembros sensibles a la regulación por ROS, como el receptor de insulina (*Insulin Receptor*, IR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*, PDGFR) (Corcoran y Cotter, 2013). La oxidación inactivante de las PTP favorece en gran medida la señalización iniciada por los RTK. Además, a partir de los RTK se desencadena una cascada de señales mediada por la activación secuencial de c-Src y Rac, que finalmente induce la generación de ROS por parte de la NOX, lo que constituye un bucle de retroalimentación positiva de la activación de los RTK iniciada por las ROS (Chiarugi y Cirri, 2003).

También pueden ser activadas por ROS todas las rutas de señalización iniciadas por quinasas activadas por mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK), que en mamíferos convergen en tres vías principales: las quinasas reguladas por señales extracelulares (*Extracellular signal-Regulated Kinases*, ERK), implicadas principalmente en respuestas de proliferación a factores de crecimiento, las quinasas c-Jun N-terminal (*c-Jun NH₂-terminal kinases*, JNK) y la familia MAPK p38, estando estas dos últimas relacionadas con respuestas a estrés e inducción de la apoptosis (Bartosz, 2009). Se ha propuesto que bajos niveles intracelulares de ROS promueven la proliferación mediada por la vía ERK, mientras que niveles más elevados de ROS dan como resultado la parada del ciclo celular mediada por JNK y p38 (Corcoran y Cotter, 2013).

Por otra parte, las ROS están también directamente implicadas en el proceso de cicatrización de heridas, que requiere un balance óptimo entre los beneficios potencialmente aportados por las ROS, a favor de la correcta regeneración del tejido dañado, y sus características citotóxicas, que contribuyen a eliminar los agentes infecciosos (Bryan y col., 2012). El impedimento de la función de cicatrización observado en ratones deficientes en la proteína Rac1, esencial para el ensamblaje del complejo NOX, sugiere que el mecanismo es dependiente de la producción de ROS, implicada en los procesos de proliferación y migración de los queratinocitos (Tschardt y col., 2007).

1.4. Fotogeneración de especies reactivas de oxígeno

El uso del tratamiento fotodinámico (TF) está ampliamente extendido en la clínica como terapia contra distintos tipos de cáncer de piel, además de otras afecciones (Babilas y col., 2010; Agostinis y col., 2011). Su aplicación se basa en la utilización de compuestos fotosensibilizadores (FS) que, administrados de forma exógena o sintetizados endógenamente, se acumulan preferentemente en los tejidos tumorales. Durante el TF, la activación del FS por luz de longitud de onda adecuada —preferiblemente roja ($\lambda \geq 600$ nm), por su mayor capacidad de penetración en los tejidos— en presencia de oxígeno conduce a la generación de ROS, fundamentalmente oxígeno singlete. El TF requiere, por tanto, la combinación de tres elementos que no son tóxicos por sí mismos: oxígeno molecular, un FS incorporado en el tejido diana y luz de longitud de onda apropiada (Agostinis y col., 2011). En función de la cantidad producida y de su localización en el tejido, las ROS producidas pueden inducir la muerte celular de forma selectiva en las células malignas o pre-malignas (siendo éste el objetivo de la terapia fotodinámica), o bien modificar ciertas funciones celulares (Babilas y col., 2010) (Fig. 4).

El mecanismo de acción del TF tiene como punto de partida la absorción de luz por parte del FS en estado basal que, al excitarse como consecuencia de la irradiación, experimenta una transición a un estado de mayor energía denominado singlete, de vida media muy corta. El FS activado puede pasar al estado triplete, de menor energía y más estable que el anterior, desde el cual, a su vez, es susceptible de transferir carga y/o energía de excitación a otras moléculas en distintos tipos de reacciones foto-oxidativas. Durante el TF se produce una transferencia directa de energía y/o electrones al oxígeno molecular en su estado basal de triplete ($^3\text{O}_2$), formándose oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), responsable de la mayor parte de los efectos biológicos del tratamiento (Szeimies y col., 2009) (Fig. 4).

Las propiedades físico-químicas del compuesto FS son esenciales para establecer la eficacia del TF. Las características que determinan la idoneidad de un FS incluyen: pureza química; capacidad de localizarse específicamente en el tejido neoplásico; corto intervalo de tiempo entre la administración del compuesto y su pico de acumulación en el tumor; corta vida media y rápida eliminación de los tejidos normales; activación

bajo luz de longitud de onda con una óptima penetración en el tejido; elevado rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete; y ausencia de toxicidad en oscuridad (Juarranz y col., 2008). Inicialmente se aprobó para su utilización en terapia fotodinámica el porfímero sódico (Photofrin), purificado a partir del derivado hematoporfirínico, como FS de uso sistémico. La principal desventaja del uso de estos compuestos es la prolongada fotosensibilización que provocan, que puede durar varias semanas (Szeimies y col., 2005).

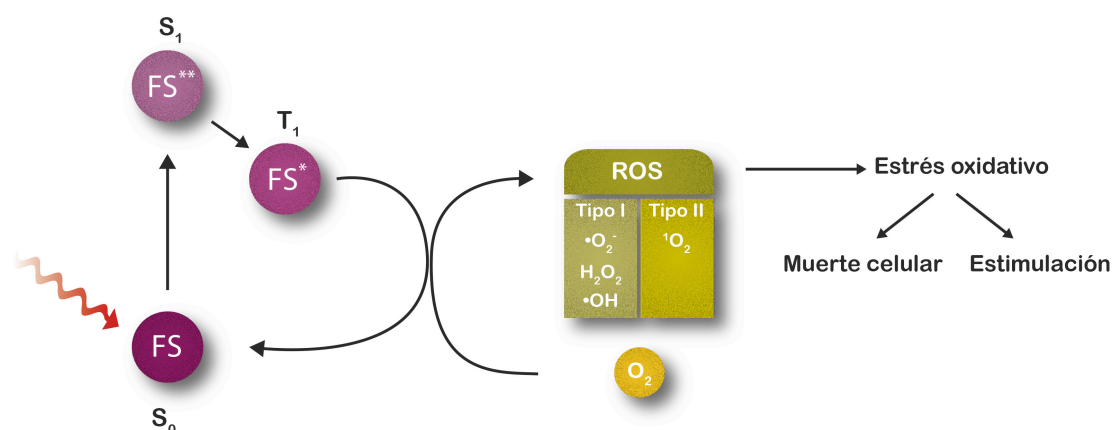


Fig. 4 | Mecanismo de acción del tratamiento fotodinámico. El TF requiere la coexistencia de tres elementos: fotosensibilizador (FS), luz y oxígeno. El FS en su estado fundamental (S_0) absorbe luz, pasando a un estado excitado denominado singlete (S_1), seguido por una transición al estado triplete (T_1). La transferencia de energía al O_2 induce la generación de ROS, que puede conducir a la muerte de las células o inducir su activación.

El grupo de Kennedy marcó un hito en el desarrollo de la terapia fotodinámica en dermatología al introducir el uso de los precursores de porfirinas como el ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Kennedy y col., 1990) y, más tarde, su derivado metilado, el metil- δ -aminolevulinato (m-ALA), por tratarse de moléculas de pequeño tamaño capaces de penetrar a través de la epidermis gracias a su bajo peso molecular, lo que hace posible su aplicación tópica (Babilas y col., 2010). La actividad esterasa en las células y tejidos conduce a la producción de ALA a partir de sus derivados ésteres hidrocarbonados como el m-ALA (Peng y col., 1997). Tras la aplicación tópica, tanto el ALA como el m-ALA, que no son fotoactivos por sí mismos pero se acumulan preferentemente en las células tumorales, son metabolizados a través de la ruta de

síntesis del grupo hemo para dar lugar a la protoporfirina IX (PpIX) (**Fig. 5**). El compuesto fotoactivo PpIX presenta máximos de absorción en la región cercana al ultravioleta (UV) y en la región roja del espectro visible —a 409 nm y 634 nm, respectivamente— y emite fluorescencia roja a 635 nm. Además, en ausencia de iluminación, la PpIX es metabolizada hacia el grupo hemo en un intervalo de 24 a 48 h, desapareciendo así el problema de la fotosensibilización cutánea en un breve período de tiempo (Szeimies y col., 2005).

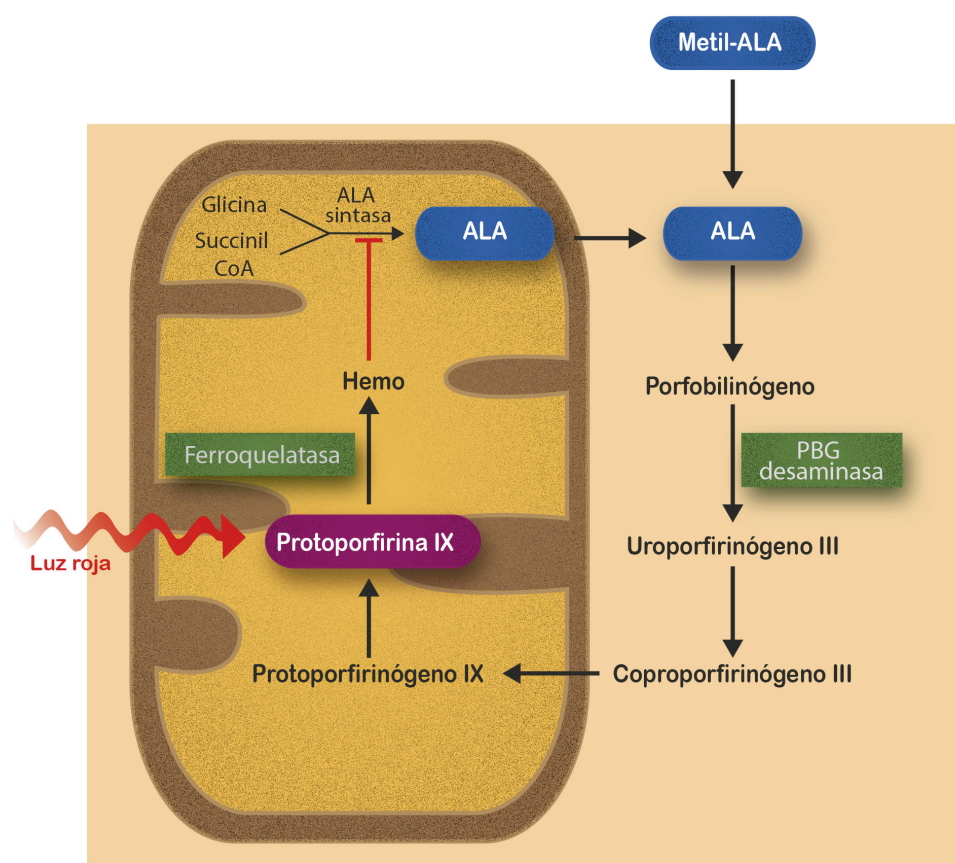


Fig. 5 | Ruta metabólica de biosíntesis del grupo hemo. La enzima limitante de esta ruta es regulada negativamente por el producto final de la misma, el grupo hemo libre, que inhibe la síntesis de ALA a partir de glicina y succinil-CoA catalizada por la ALA sintasa. El aporte exógeno de ALA (o m-ALA) supone la incorporación de este precursor a la ruta evitando el mecanismo de retroalimentación negativa, lo que induce la acumulación de los metabolitos subsiguientes en la célula. Este hecho, junto con la alteración generalizada en las células tumorales de la función enzimas implicadas en esta ruta, contribuye a la acumulación selectiva de los metabolitos subsiguientes en la célula, particularmente el compuesto fotoactivo protoporfirina IX (PpIX).

En el primer paso de la ruta biosintética del grupo hemo (**Fig. 5**), catalizado por la enzima ALA sintasa, se genera ALA a partir de glicina y succinil coenzima A. La porfobilinógeno desaminasa (PBGD) es otra enzima implicada en la ruta, que cataliza la formación de uroporfirinógeno a partir de porfobilinógeno. El paso final es la incorporación de hierro a la PpIX, que tiene lugar en la mitocondria bajo la acción de la enzima ferroquelatasa. Hay varias razones que explican la acumulación preferente del compuesto FS endógeno PpIX en las células tumorales. En primer lugar, la falta de integridad del estrato córneo en las regiones afectadas favorece la penetración de la droga o sus moléculas precursoras. Del mismo modo, la estructura alterada del estroma tumoral, con amplios espacios intersticiales, permite una difusión más rápida de la molécula hidrofílica de ALA en comparación con el tejido normal ([Szeimies y col., 2009](#)). Además, el déficit relativo de Fe^{2+} en las células tumorales como consecuencia de su elevada tasa de proliferación, junto con alteraciones a nivel enzimático comúnmente detectadas en las células tumorales, como son la actividad incrementada de la PBGD y la disminución en los niveles de ferroquelatasa, contribuyen a la acumulación de PpIX en los tejidos neoplásicos ([Peng y col., 1997](#); [Ishizuka y col., 2011](#)).

La característica más destacable de estos precursores de porfirinas es su selectividad tumoral. El ALA presenta una elevada selectividad tras su aplicación tópica, con un ratio de 10:1 entre el tejido afectado (tumor) y las regiones circundantes ([Szeimies y col., 2009](#)). El m-ALA muestra mayor selectividad que el ALA, debido a que es incorporado a las células por un mecanismo diferente como resultado de su estructura más lipofílica ([Szeimies y col., 2005](#)).

Actualmente, el único FS aprobado en Europa para su aplicación en dermatología es el m-ALA en su forma de crema comercial (Metvix, Photocure ASA, Oslo, Noruega y Galderma SA, París, Francia). La terapia fotodinámica utilizando Metvix en combinación con luz roja está aprobada para el tratamiento del carcinoma basocelular superficial y nodular, así como la queratosis actínica ([Szeimies y col., 2005](#); [Juarranz y col., 2008](#); [Braathen y col., 2012](#)).

Por otra parte, las células epiteliales y las unidades pilosebáceas sintetizan mayores cantidades de porfirinas que los fibroblastos, los miocitos y las células

endoteliales (Szeimies y col., 2009). La producción de porfirinas relativamente más elevada en las zonas afectadas por un proceso neoplásico, en comparación con la epidermis adyacente y las células de origen mesenquimático, posibilita tanto la fotodetección de lesiones por fluorescencia como la destrucción selectiva del tumor tras la irradiación, causando un daño mínimo al tejido circundante (Ishizuka y col., 2011). Todas estas características convierten a la terapia fotodinámica en una modalidad terapéutica mínimamente invasiva con excelentes resultados cosméticos (Szeimies y col., 2005; Kohl y col., 2010). De hecho, se ha descrito que la terapia fotodinámica con ALA afecta positivamente a la piel tratada adyacente a la lesión, induciendo la reestructuración tridimensional de los queratinocitos en la epidermis, la disminución de mastocitos en la dermis, el incremento en la elasticidad del tejido y el aumento en la producción de colágeno I (Uebelhoefer y Dover, 2005; Kohl y col., 2010), efectos que podrían explicarse en función de la producción relativamente baja de PpIX —y consecuentemente de ROS— en las células sanas en comparación con las tumorales. Esta idea está de acuerdo con el papel fisiológico conferido a las ROS en bajos niveles como moléculas señalizadoras capaces de modular la progresión del ciclo celular (Boonstra y Post, 2004). Asimismo, es coherente con las evidencias de que existe una relación directa entre los niveles de ROS y las respuestas celulares causadas, determinando una escala en la que la exposición de las células a bajos niveles de ROS induce proliferación, niveles mayores causan la muerte celular por apoptosis y niveles aún más elevados son responsables de la muerte por necrosis (Bartosz, 2009). No obstante, el efecto del TF con m-ALA sobre los tejidos normales yuxtapuestos a las regiones alteradas constituye un aspecto importante y poco estudiado. Resultados previos obtenidos *in vitro* en nuestro laboratorio indican que el TF con m-ALA en queratinocitos humanos inmortalizados en condiciones en las que se induce una baja producción de ROS promueven la proliferación celular por medio de un mecanismo esencialmente dependiente de la quinasa c-Src. En conjunto, estas observaciones sugieren que la generación de niveles moderados de ROS podría estar implicada en la modulación de la homeostasis cutánea, cuyo mantenimiento se basa en la actividad de las células troncales epidérmicas.

II. Hipótesis y objetivos

Cada vez son más las evidencias que indican la relevancia biológica de una producción controlada de ROS como mecanismo regulador de importantes funciones celulares. Desde esta perspectiva, la mejora generalizada de la piel circundante tras la aplicación del TF sobre determinadas lesiones dermatológicas sugiere que una producción intracelular de ROS relativamente baja en las zonas adyacentes a la lesión podría tener un papel estimulador de la reparación celular y tisular, favoreciendo la remodelación de la zona afectada. Asimismo, estas observaciones sugieren que, en determinadas condiciones, la producción local y transitoria de ROS puede modular positivamente la homeostasis cutánea, un proceso directamente dependiente de la actividad de las células troncales de la piel.

Por todo ello, la utilización del TF con m-ALA y luz roja para inducir la producción de ROS *in vivo* dependiente del FS endógeno PpIX proporciona un marco experimental óptimo para investigar las funciones fisiológicas de las ROS en la piel, así como para identificar y caracterizar nuevos factores y mecanismos de señalización implicados en la regulación funcional de las células troncales adultas y la homeostasis cutánea. Además, podría contribuir a la identificación de nuevas dianas terapéuticas y al desarrollo e implementación de nuevas herramientas en el campo de la biomedicina regenerativa.

En este contexto, el **objetivo general** de este trabajo consiste en **demostrar la implicación de las ROS en la regulación funcional de la homeostasis tisular *in vivo* en mamíferos, utilizando como modelo experimental la piel y el folículo piloso del ratón.**

El abordaje de este objetivo general se plantea a través de los siguientes objetivos específicos:

i) Analizar la capacidad de la producción endógena de ROS inducida en la piel por el TF con m-ALA y luz roja para regular *in vivo* la proliferación y movilización de las células troncales residentes en la región prominente del folículo piloso.

ii) Determinar los efectos de esta producción endógena y transitoria de ROS en procesos dependientes de los mecanismos de regulación de la homeostasis cutánea, como el ciclo de crecimiento del pelo y la regeneración de lesiones por quemadura.

iii) Caracterizar los mecanismos moleculares potencialmente implicados en la estimulación de la homeostasis cutánea en respuesta a una producción endógena y transitoria de ROS.

III. Materiales y Métodos

3.1. Animales de experimentación

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado ratones de la línea C57BL/6j, de 7 semanas de edad y unos 20 g de peso corporal al inicio de los experimentos, producidos en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (IIBm, CSIC-UAM, Madrid). En cada diseño experimental, las comparaciones se establecieron entre animales del mismo sexo, preferentemente hermanos de camada, incluyendo un mínimo de 3 ratones por cada grupo y experimento. También se utilizó la línea B6.Cg-Tg(Krt1-15-EGFP)2Cot/J (Morris y col., 2004), que expresa la proteína EGFP bajo el control del promotor del gen *K15*. Los animales fueron estabulados en el animalario del IIBm. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo conforme a lo establecido en el RD 1201/2005 y el RD 53/2013 (España), o bien fueron aprobados por el *Subcommittee on Research Animal Care* (IACUC) del *Massachusetts General Hospital* (Boston, MA), de acuerdo con las directrices de la agencia *National Institutes of Health* (NIH).

3.2. Identificación de células quiescentes en tejidos adultos

Las células troncales adultas se definen esencialmente por su baja tasa de replicación y el mantenimiento mayoritario del estado quiescente, por lo que se identificaron en la piel como LRC, siguiendo los protocolos previamente descritos (Braun y col., 2003). Brevemente, los ratones de 10 días de edad recibieron diariamente, durante 4 días consecutivos, una inyección intraperitoneal (i.p.) de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; Sigma-Aldrich) en una dosis de 50 mg/kg de peso corporal, disuelta a una concentración de 6,25 mg/ml en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM). Tras el marcaje, los animales se mantuvieron hasta alcanzar las 7 semanas de edad. Las LRC se detectaron mediante inmunofluorescencia en montajes *in toto* (*whole-mounts*) de epidermis de la cola y se analizaron por microscopía confocal.

3.3. Aislamiento de la piel de la cola y preparación de montajes *in toto*

Para el aislamiento de la epidermis, la piel de la cola se procesó según en protocolo descrito por el grupo de Braun (Braun y col., 2003). Inmediatamente

después de sacrificar al animal, se realizó una incisión con ayuda de un bisturí en la zona ventral de la cola, se separó la cola del cuerpo y se escindió manualmente la piel en una única pieza. La piel caudal se incubó con EDTA 5 mM en PBS durante 4 h a 37 °C. A continuación, con ayuda de dos pinzas se separó la epidermis como una capa íntegra conteniendo los folículos pilosos y se descartó la dermis subyacente. Las muestras de epidermis se procesaron dependiendo de los distintos análisis: i) se montaron en fresco sobre cubreobjetos para la detección de PpIX; ii) se almacenaron a -80 °C para la posterior extracción de ARN; iii) se fijaron en formaldehído 3,7% en PBS durante un mínimo de 48 h a 4 °C, lavando a continuación abundantemente con PBS y almacenando las muestras en PBS con azida sódica 0,02% a 4 °C hasta su procesamiento para la inmunodetección de antígenos o para el ensayo TUNEL. Para la preparación de montajes *in toto*, se seccionaron piezas de epidermis de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm y se colocaron sobre portaobjetos, manteniendo expuesta la cara interna de la epidermis, en contacto con el cubreobjetos.

3.4. Tratamiento fotodinámico con m-ALA y detección de PpIX

Los tratamientos fotodinámicos se llevaron a cabo utilizando m-ALA en su forma de crema comercial (Metvix, Galderma). Para el tratamiento de la piel de la cola, la crema con m-ALA se aplicó directamente sobre la piel. En el caso de la piel dorsal del lomo, previamente se eliminó el pelo de la región o regiones de interés utilizando una rasuradora eléctrica y crema depilatoria (Veet), tras lo cual la piel se lavó abundantemente con PBS antes de proceder a la aplicación de m-ALA en crema sobre el área correspondiente durante 2,5 h en oscuridad. Para aquellos experimentos en los que se comparó la respuesta de la piel control y tratada en un mismo ratón con el fin de evitar las posibles diferencias inter-individuales, se rasuraron dos áreas separadas de la piel dorsal y se aplicó m-ALA únicamente en la región derecha, manteniendo la izquierda como control. Posteriormente, los animales fueron anestesiados, bien mediante inyección i.p. con una mezcla compuesta por ketamina (100 mg/kg de peso corporal) y xilazina (10 mg/kg) o bien utilizando 2% isoflurano, y se retiró el exceso de crema lavando con PBS.

La producción de PpIX en la piel tras la incubación con m-ALA se analizó mediante la detección de la fluorescencia roja (635 nm) emitida por la PpIX al ser excitada con luz de longitud de onda apropiada. Para determinar la producción de PpIX a gran escala en la piel dorsal se utilizó una cámara digital (Olympus C7070 Wide zoom) acoplada a flashes de luz de 407 nm de longitud de onda (ClearStone 36-POZ-UV), correspondiente al pico máximo de excitación de la porfirina (banda de Soret). Con el fin de caracterizar en detalle la localización de la PpIX en el tejido, se utilizó la epidermis de la cola. Para ello, la piel caudal se incubó *ex vivo* con EDTA 5 mM y m-ALA 2 mM (Sigma, Aldrich) en PBS, durante 4 h a 37 °C, y se separó la epidermis de la dermis. Inmediatamente después, la epidermis se montó en fresco en PBS y se analizó en el microscopio de fluorescencia, excitando con luz UV de 365 nm y recogiendo la fluorescencia roja emitida por la PpIX.

Para completar el TF una vez determinada la producción de PpIX en la piel dorsal del lomo, los ratones anestesiados fueron irradiados con luz roja de 636 nm de longitud de onda hasta alcanzar una dosis de 2,5 J/cm² para la piel dorsal del lomo o 10 J/cm² para la cola. Se utilizó una lámpara (Aktilite, Photocure ASA) de diodos emisores de luz (*Light Emitting Diodes*, LED), con una irradiancia de 36 mW/cm² al situar la fuente a 8,5 cm de distancia del animal. Tras la irradiación, los ratones se mantuvieron sobre una manta térmica hasta su completa recuperación. Posteriormente, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO₂ a tiempos concretos después del tratamiento y las muestras de piel de la cola y/o del lomo se recogieron y procesaron para los diferentes análisis.

En los experimentos de cicatrización de lesiones por quemadura, el TF se llevó a cabo 24 h después de realizar las quemaduras. Se aplicaron 25 mg de la crema con m-ALA cubriendo el área lesionada y los bordes adyacentes (aproximadamente 2 mm hacia el exterior de la región afectada por la quemadura). La incubación con m-ALA e irradiación con luz roja (2,5 J/cm²) se realizaron de la forma descrita anteriormente.

La administración del compuesto antioxidante N-acetil-cisteína (NAC; Sigma-Aldrich) se llevó a cabo mediante inyección i.p. (35 mg/ml en PBS;

200 mg/kg/día), una vez diaria durante 10 días consecutivos, finalizando el mismo día de aplicación del TF.

3.5. Detección de ROS en la piel

3.5.1. Detección de ROS *in vivo*

Para detectar *in vivo* las ROS fotogeneradas, de forma simultánea a la aplicación del TF sobre la piel dorsal del lomo se administró tópicamente el compuesto 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína diacetato (DHF-DA), tanto sobre la piel sometida al TF como sobre el área control luz. Para ello, el DHF-DA se disolvió inicialmente en etanol absoluto a una concentración de 2 mg/ml, preparando la solución de trabajo 1 mg/ml en etanol 50% en el momento de su uso. Previamente a la aplicación de m-ALA, se añadieron 100 µl de DHF-DA 1 mg/ml sobre cada una de las regiones con ayuda de una micropipeta. Una vez evaporada la solución, se aplicó m-ALA en crema sobre el área del lado derecho y se mantuvo durante 2,5 h de incubación, trabajando a partir de este momento en oscuridad. Posteriormente, se procedió a retirar el exceso de crema de la piel lavando con PBS y se añadieron nuevamente 100 µl de DHF-DA 1 mg/ml sobre cada una de las regiones. Tras 45 min de incubación, los ratones fueron anestesiados con 2% isoflurano, se comprobó la producción de PpIX y se irradiaron ambas áreas de piel con luz roja (2,5 J/cm²). La generación de ROS en la piel se evaluó indirectamente, determinando los niveles de 2',7'-dicloro-fluoresceína (DF) generada al reaccionar el DHF-DA incorporado por las células con las ROS producidas por el efecto fotodinámico. La fluorescencia emitida por la DF se detectó utilizando el sistema de imagen IVIS Lumina 2 (Xenogen, Caliper), seleccionando los filtros de 445-490 nm para la excitación y 515-575 nm para la emisión. El sistema está acoplado a una cámara digital refrigerada (CCD, Andor Technology) y utiliza el programa Living Image para el procesamiento de imágenes.

3.5.2. Localización de ROS *ex vivo*

Para la localización de ROS *ex vivo*, la piel de la cola de los ratones se incubó en EDTA 5 mM en PBS y m-ALA 2 mM, durante 3 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se añadió hidroetidina (dihidroetidina, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 3,2 µM

a partir de un stock 25 mg/ml en DMSO y se incubaron las muestras durante 1 h a 37 °C. Seguidamente, la piel se irradió con luz de 636 nm por la cara de la epidermis hasta alcanzar una dosis de 10 J/cm². Inmediatamente después se procedió a separar y fijar la epidermis en formaldehído de la forma previamente descrita para preparar los montajes *in toto*. La producción y localización de ROS se determinó por microscopía confocal, detectando la emisión del compuesto fluorescente rojo 2-hidroxi-etidio —con picos de excitación a 535 nm y de emisión a 610 nm— generado por la reacción de la hidroetidina con las ROS.

3.6. Modelo de quemadura en piel de ratón

Para realizar las quemaduras en la piel, los animales fueron anestesiados mediante inyección i.p. con el cóctel de ketamina/xilazina previamente descrito y la piel dorsal del lomo se rasuró completamente. Siguiendo el protocolo utilizado en estudios previos (Dai y col., 2011), se precalentó (≈95 °C) una barra metálica de 1 cm x 1 cm de sección transversal mediante inmersión en agua hirviendo y se aplicó sobre la superficie de la piel, manteniéndola en contacto con la misma durante 5 segundos. Las quemaduras resultantes mostraron una extensión aproximada de 1,3 cm x 1,3 cm. Inmediatamente después de la generación de las quemaduras, se administró a los animales 1 ml de solución salina (NaCl 0,9%) mediante inyección i.p., con el fin de prevenir la deshidratación. La evolución de las quemaduras se registró diariamente mediante la adquisición de imágenes digitales.

Se incluyó un grupo adicional de ratones a partir de los cuales se tomaron muestras de piel de las quemaduras sometidas a TF y sus correspondientes controles para su procesamiento histológico y el análisis mediante inmunohistoquímica de las células en proliferación en el tejido, identificadas por medio de la incorporación de una marca nuclear del análogo de nucleótido BrdU en los animales adultos. Para ello, los ratones recibieron BrdU vía i.p. (12,5 mg/ml en PBS, 50 mg/kg de peso corporal), comenzando 4 h tras el TF y repetidamente cada 12 h hasta el sacrificio y la recogida de muestras, que se llevó a cabo 24 y 48 h después del tratamiento (administrando un total de 2 o 4 inyecciones, respectivamente).

3.7. Procesamiento histológico

Las muestras de piel tomadas a tiempos concretos después de los distintos tratamientos se fijaron en formaldehído 3,7% en PBS durante al menos 48 h a 4 °C, se lavaron abundantemente en agua destilada y se incluyeron en parafina siguiendo los procedimientos histológicos habituales. Las secciones histológicas de 5 µm se montaron sobre portaobjetos con carga electrostática (Superfrost Plus, Thermo Scientific). Las muestras se desparafinaron e hidrataron antes de proceder a su tinción con hematoxilina-eosina (H-E) o tricrómico de Masson, tras lo cual se deshidrataron y se montaron en definitivo con DePeX (Serva).

3.8. Métodos inmunológicos y enzimáticos

3.8.1. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se recogen en la **Tabla 1**.

Anticuerpo	Animal de fabricación	Casa comercial	Aplicación
Anti-BrdU-FITC	Ratón (m)	Roche	IF
Anti-BrdU	Ratón (m)	Sigma	IHQ
Anti-Src	Conejo (p)	Abcam	IF
Anti-Src	Conejo (m)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-fosfo-Src (Tyr416)	Conejo (m)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-p38 MAPK	Conejo (m)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-fosfo-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)	Conejo (m)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-p44/42 MAPK	Conejo (m)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Conejo (m)	Cell Signaling Technology	WB

Anti-fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Conejo (m)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-fosfo-histona H2AX (Ser139)	Conejo (m)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-AKT	Conejo (m)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-fosfo-AKT (Ser473)	Conejo (m)	Cell Signaling Technology	WB
Anti- β -catenina	Ratón (m)	BD	IF, WB
Anti- β -catenina-activa	Ratón (m)	Millipore	WB
Anti- α -tubulina	Ratón (m)	Sigma	WB
Anti-Prl2c3	Cabra (p)	Santa Cruz Biotechnology	IF
Anti-IgG de conejo-Alexa Fluor 546	Cabra	Molecular Probes	IF
Anti-IgG de cabra-Alexa Fluor 488	Burro	Molecular Probes	IF
Anti-IgG de cabra-Cy3	Burro	Jackson ImmunoResearch	IF
Anti-IgG de ratón-HRP	Oveja	Amersham	WB
Anti-IgG de conejo-HRP	Burro	Amersham	WB
Anti-IgG de cabra-HRP	Burro	Santa Cruz Biotechnology	WB
EnVision Flex/HRP (anti-IgG de ratón y conejo)		Dako	IHQ

Tabla 1 | Anticuerpos. La tabla recoge los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, especificando el antígeno reconocido (IgG: inmunoglobulina) y las moléculas con las que están conjugados (FITC: isotiocianato de fluoresceína; HRP: peroxidasa de rábano picante, *horseradish peroxidase*; Cy3: cianina 3, *cyanine 3*). También se detalla el animal en el que se obtuvieron, su carácter monoclonal (m) o policlonal (p), el fabricante y el tipo de análisis para el que se usaron (IF: inmunofluorescencia; WB: inmunoblot; IHQ: inmunohistoquímica).

3.8.2. Inmunofluorescencia en montajes *in toto* de epidermis de la cola

La detección de las células marcadas con BrdU en la epidermis caudal se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia. Para favorecer la exposición del antígeno, las piezas de epidermis de la cola previamente fijadas se trataron secuencialmente con HCl 1 N (45 min a 37 °C), tris-borato-EDTA (5 min a TA) y se lavaron con agua destilada. Seguidamente, las muestras se permeabilizaron y bloquearon con tampón PTG (Triton X-100 0,5%, gelatina 0,2% en PBS) durante 1 h a TA y se incubaron con el anticuerpo primario anti-BrdU-FITC durante toda la noche a 37 °C. Para la detección de γ H2AX (histona H2AX fosforilada en la Ser139), las muestras de epidermis de la cola se permeabilizaron y bloquearon según el procedimiento descrito anteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario, 1 h a 37 °C, se lavaron abundantemente con PBS y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario, durante 45 min a TA. Las diluciones de los anticuerpos se prepararon en PBS a las concentraciones indicadas en cada caso por el fabricante. Las muestras utilizadas como control positivo de la expresión de γ H2AX se obtuvieron a partir de animales expuestos a una dosis de 7,44 J/cm² de luz UVB, utilizando una lámpara Philips TL UV (3,1 mW/cm² de irradiancia a una distancia de 15 cm) con un pico de emisión a 312 nm de longitud de onda. Finalmente, todas las muestras se lavaron repetidamente con PBS y se montaron con Vectashield (Vector Labs) conteniendo 5 ng/ml de DAPI (Merck) para la contra-tinción nuclear.

3.8.3. Inmunofluorescencia en cortes de tejido incluidos en parafina

Tras desparafinar e hidratar las secciones histológicas de piel, se procedió a su permeabilización con Triton X-100 0,1% en PBS, se eliminó la auto-fluorescencia incubando con NH₄Cl 50 mM (10 min a TA) y se utilizó para bloquear albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) 0,3% en PBS, 1 h a TA. A continuación, las muestras se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios toda la noche a 4 °C, se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado durante 1 h a TA, utilizando diluciones de los anticuerpos en PBS a las concentraciones recomendadas por la casa comercial. Por último, las muestras se lavaron en PBS y se montaron con Vectashield-DAPI.

3.8.4. Inmunohistoquímica en cortes de tejido incluidos en parafina

Las secciones histológicas desparafinadas e hidratadas se lavaron en PBS 15 min a TA, se sumergieron en 3% H₂O₂ 10 min a 37 °C, se lavaron nuevamente en PBS y se incubaron con HCl 2 N, 30 min a 37 °C. A continuación, las muestras se incubaron con tripsina (Thermo Scientific) 30 min a 37 °C, seguidamente se cubrieron con suero de bloqueo (Dako) 15 min a 37 °C y se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-BrdU, diluido en suero de bloqueo a la concentración recomendada por el fabricante. Después de tres lavados de 5 min con PBS, se procedió a incubarlo durante 30 min a TA con el reactivo Envision Flex/HRP (Dako), consistente en un polímero marcado con HRP y conjugado con anticuerpos secundarios capaces de reconocer inmunoglobulinas de ratón y conejo, tras lo cual se lavaron las muestras otros 5 min. El revelado se llevó a cabo utilizando el kit DAB (Vector Laboratories) y, tras lavar 10 min con agua destilada y realizar la tinción nuclear con hematoxilina, se procedió a deshidratar y montar las muestras con DePeX.

3.8.5. Extracción de proteínas y análisis de expresión mediante inmunoblot

Las muestras de epidermis de piel de la cola almacenadas a -80 °C se homogeneizaron en tampón NT (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 5 mM, 1% NP-40 y 1% Triton X-100) a 4 °C con inhibidores de proteasas y fosfatasa (PMSF 2 mM, aprotinina 20 µg/ml y ortovanadato sódico 1 mM; todos de Sigma-Aldrich) con ayuda de tijeras y un Polytron (PT 1200 E, Kinematica). Después de ser incubadas toda la noche en agitación a 4 °C, las muestras se centrifugaron (12.000 rpm, 20 min, 4 °C) y se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó utilizando el método colorimétrico del ácido bicinónico (BCA, Pierce). El volumen necesario de cada extracto correspondiente a 40 µg de proteína por cada animal y condición se resuspendió en tampón Laemmli (BioRad), las muestras se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida al 7,5-10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF de 0,45 µm de poro (BioTrace™). Las membranas se bloquearon en tampón NET (gelatina 0,25%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0,05%) conteniendo 0,5% BSA, 30 min a TA, se incubaron con los anticuerpos primarios

durante toda la noche a 4 °C y, a continuación, se lavaron abundantemente en tampón NET. Finalmente, las membranas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase*, HRP) y se lavaron abundantemente con tampón NET, tras lo cual se detectó la actividad peroxidasa mediante quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham). Los anticuerpos primarios y secundarios se prepararon según las diluciones recomendadas por el fabricante. Las bandas correspondientes a la expresión de las diferentes proteínas fueron digitalizadas utilizando el programa Photoshop CS3 Extended, versión 10.0.1 (Adobe).

3.8.6. Ensayo TUNEL

La muerte celular potencialmente inducida por el TF en los folículos pilosos se analizó mediante el ensayo TUNEL en montajes *in toto* de epidermis de la cola. Brevemente, las muestras de epidermis previamente fijadas en formaldehído 3,7% se permeabilizaron en Triton X-100 0,1% (30 min a TA) y se incubaron con la mezcla de reactivos indicada por el fabricante (Roche) durante 40 min a 37 °C. Finalmente, las muestras se lavaron abundantemente con PBS y se montaron sobre porta-objetos utilizando Vectashield-DAPI.

3.9. Extracción de ARN y análisis de expresión génica a nivel transcripcional

3.9.1. Extracción de ARN

La obtención de ARN a partir de la epidermis de la cola y de la piel del lomo se realizó mediante una extracción orgánica con TriPure Isolation Reagent (Roche) seguida de una purificación en columna (RNeasy Mini kit, Qiagen). Brevemente, se disgregó el tejido con tijeras y se homogeneizó en la solución TriPure con ayuda de un Polytron. Posteriormente, se procedió a la separación de fases añadiendo cloroformo (Merck) al homogeneizado y centrifugando las muestras (12.000 rpm, 15 min, 4 °C). Por último, el ARN se purificó en columna a partir de la fase superior incolora, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Durante el proceso de extracción, las muestras se trataron con DNasa (RNase-Free DNase Set, Qiagen) para evitar la

contaminación con ADN genómico. La concentración de ARN y su pureza (ratio $A_{260}:A_{280} \geq 1,8$) se determinaron mediante espectrofotometría utilizando un Nanodrop ND1000 (Nanodrop Technologies). La integridad del ARN obtenido se determinó por medio del *RNA Integrity Number* (RIN), utilizando el bioanalizador 2100 (Agilent Technologies).

3.9.2. Análisis de expresión génica a gran escala

Para determinar los cambios de expresión génica a gran escala se utilizaron micro-matrices (*micro-arrays*) Agilent.SingleColor.14868 (Agilent Technologies). El análisis se realizó a partir de muestras de piel dorsal del lomo y epidermis de la cola tomadas 2 días después de los tratamientos (control y TF). Se mezclaron cantidades equivalentes de ARN obtenido de 3 animales diferentes por cada condición y se analizaron y compararon entre sí por separado las mezclas procedentes de la piel dorsal del lomo y de la epidermis de la cola.

3.9.3. Análisis de expresión génica por retrotranscripción de ARNm y PCR cuantitativa en tiempo real

Los análisis de expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real a partir de ARNm retrotranscrito (qRT-PCR) se llevaron a cabo a partir de muestras de piel del lomo obtenidas tanto 2 como 6 días después de los tratamientos (control luz y TF), a partir de 8 ratones diferentes en cada caso. Todas las muestras se analizaron independientemente. Se utilizó el sistema Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR con SYBR Green, usando los oligonucleótidos cebadores referidos en la **Tabla 2** y tomando la expresión del ARN ribosómico 18S como control endógeno.

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
<i>Prl2c3</i>	TCAACCATGCTCCTGGATACTG	GGCAACATTCTTCCACAATAACG
<i>S100A8</i>	GAGTGTCTCAGTTTGTGCAGAATAT	CGAAGTTAATTGCATTGTCACTATTGA
<i>c-myc</i>	GACGAGCGTCACTGATAGATTGG	AGCAAGGGAAGCAAGTCTAGAGTT
<i>Jag1</i>	ACCACCTGCGAAGTGATTGAC	GAGATATACCGCACCCCTTCAG
<i>Ovol1</i>	CTCCACGTGCAAGAGGAACT	CTCTGGTTCCTCGGTAGGG
<i>Axina2</i>	CCAACGACAGCGAGTTATCCA	CCATCTACGCTACTGTCCGTCAT

Tabla 2 | Oligonucleótidos cebadores utilizados en el análisis de expresión mediante qRT-PCR.

3.10. Evaluación de las muestras y análisis estadísticos

La localización microscópica de la PpIX y las secciones histológicas teñidas con H-E y tricrómico se analizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 acoplado a una cámara de captura digital Olympus DP70. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron utilizando un microscopio confocal espectral Leica TCS-SP2-AOBS. Las reconstrucciones tridimensionales se realizaron con ayuda del programa LCS Suite versión 2.61 (Leica) y posteriormente fueron procesadas con el programa Photoshop CS3 Extended versión 10.0.1 (Adobe). El análisis de LRC y de la expresión de K15-EGFP en los montajes *in toto* de epidermis se realizó sobre las imágenes obtenidas por microscopía confocal, considerando un tamaño muestral mínimo de 30 folículos por animal y un mínimo de 3 ratones por grupo. La cuantificación de LRC en la región prominente se llevó a cabo mediante el recuento del número de células positivas o por medio de la cuantificación digital de la señal detectada relativa al área (Carrasco y col., 2014), utilizando el programa ImageJ (versión 1.43u). Este último método se utilizó también para cuantificar la expresión de K15-EGFP. Los resultados de ambos análisis se representaron como valores medios \pm el error estándar. El espesor de la epidermis y la densidad celular en la dermis se cuantificaron en 10 regiones diferentes de la piel de cada ratón, considerando un mínimo de 3 animales diferentes por cada condición. Los resultados se presentaron como la media \pm la desviación típica. En todos los casos, el análisis estadístico de las

diferencias entre grupos se llevó a cabo utilizando el test t de Student para muestras independientes, con ayuda del programa SPSS (versión 15.0). Para la evaluación de los datos resultantes del ensayo de quemadura, se analizaron imágenes digitales obtenidas durante el transcurso del experimento a partir de 4 animales por grupo. El área no cicatrizada se cuantificó utilizando el programa ImageJ y se representó como la media \pm el error estándar. El área integrada bajo la curva se calculó separadamente para cada ratón y los valores medios se compararon utilizando el test t de Student para muestras independientes. El análisis estadístico de los cambios de expresión resultantes del análisis mediante micro-matrices fue realizado por NIMGenetics (<http://www.nimgenetics.com/>), utilizando un test t de Student para muestras independientes y estableciendo como umbral de significación $p \leq 0,05$ y ratio de expresión 2,0. Los datos resultantes del análisis de expresión por qRT-PCR se analizaron mediante el método comparativo Ct (Schmittgen y Livak, 2008), considerando el ARN ribosómico 18S como control endógeno para la normalización. El ratio de expresión se calculó como el cociente entre las medias de los valores $2^{-\Delta Ct}$ de los dos grupos. Los genes expresados de forma significativamente diferencial se seleccionaron en función de la comparación de los valores $2^{-\Delta Ct}$ obtenidos en ambos grupos.

IV. Resultados

4.1. El tratamiento fotodinámico con m-ALA induce la acumulación de PpIX y posterior producción de ROS *in situ* en la piel

El tratamiento tópico con m-ALA y su posterior incorporación y metabolización por parte de las células promueve una acumulación de PpIX en el tejido diana, compuesto endógeno susceptible de funcionar como agente FS (Juarranz y col., 2008). Para demostrar la producción y acumulación de PpIX en la piel de los ratones, se aplicó tópicamente m-ALA en forma de crema sobre la piel de la mitad derecha del lomo de cada ratón, mientras que la mitad izquierda se mantuvo como piel control en el mismo animal. Tras la incubación, se procedió a detectar la PpIX generada, para lo cual se tomaron imágenes del dorso de los animales bajo excitación con luz de 407 nm, correspondiente al pico máximo de excitación de la PpIX (banda de Soret). En estas condiciones, se observó una intensa fluorescencia roja característica de dicho compuesto, homogéneamente distribuida en la piel tratada con m-ALA e indetectable en la región control (**Fig. 6 A**).

A continuación, se procedió a analizar la producción de ROS *in situ* inducida en la piel por el TF. Para ello, ambas regiones de la piel dorsal de lomo de cada ratón (control y tratada con m-ALA) se irradiaron con luz roja de 636 nm de longitud de onda. De este modo, la región derecha recibió el TF completo (m-ALA + luz roja), mientras que la región izquierda se irradió exclusivamente con luz roja, manteniéndose como control luz. De forma simultánea a la aplicación del TF, se administró tópicamente DHF-DA sobre la piel de los ratones. Una vez incorporado por las células, el DHF-DA sufre ruptura molecular debido a la actividad de esterasas celulares, dando lugar a un compuesto susceptible de oxidarse en presencia de ROS. La oxidación de este compuesto origina la DF, con características fluorescentes, que funciona como sensor de la producción de ROS (Wang y col., 2013). De acuerdo con el patrón de producción de PpIX, la señal fluorescente de la DF se detectó específicamente en la piel expuesta al TF, en contraste con la región de piel control luz (**Fig. 6 B**). Estos resultados indican que los queratinocitos de la piel dorsal del lomo de los ratones son capaces de producir y acumular PpIX como consecuencia de la metabolización del m-ALA aportado exógenamente y demuestran la producción de ROS en el tejido tras el TF completo.

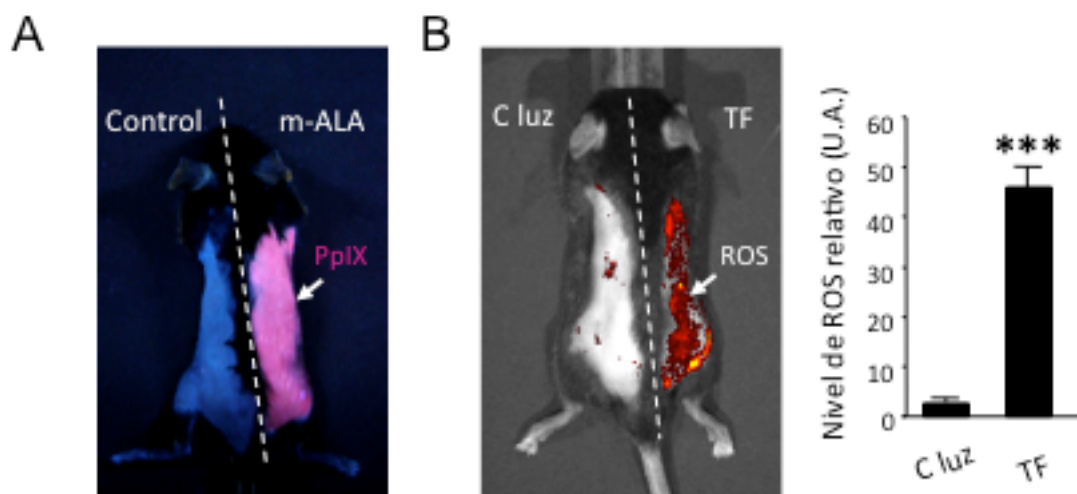


Fig. 6 | Producción de PpIX y ROS en la piel. **A)** La producción de PpIX a partir de m-ALA en la piel se analizó mediante la detección de la fluorescencia roja característica emitida por la PpIX. La piel incubada con m-ALA mostró una señal intensa y homogénea (derecha), en contraste con la ausencia de señal en la piel control (izquierda). **B)** El nivel de ROS generadas se evaluó *in vivo* tras la aplicación del TF. Se muestra la emisión fluorescente de la DF (falso color) detectada únicamente en la piel tratada con TF (derecha), en comparación con la piel control luz (izquierda). El gráfico representa el promedio \pm la desviación típica de los valores relativos (intensidad de fluorescencia media/área), obtenido en ambas regiones para $n=4$ ratones (***, $P<0,001$). U.A., unidades arbitrarias.

Con el fin de determinar con mayor precisión el patrón de producción y localización de PpIX tras la aplicación de m-ALA y posterior producción de ROS inducida por el TF, se utilizó la piel de la cola de los ratones. La piel de esta región se caracteriza por presentar una definida disposición de los folículos pilosos, organizados en tripletes dispuestos en líneas paralelas, ofreciendo un modelo idóneo para su análisis en montajes *in toto* (Braun y col., 2003). En este caso, el tratamiento de la piel caudal se llevó a cabo *ex vivo*, utilizando m-ALA en solución a temperatura fisiológica, lo que permitió la incorporación y metabolización del compuesto precursor del FS por parte de las células. Inmediatamente después, se separó la capa de epidermis de la dermis y se determinó la producción de PpIX mediante microscopía de fluorescencia, utilizando luz de excitación de 365 nm. La emisión de fluorescencia roja debida a la acumulación de PpIX se localizó preferentemente en las regiones correspondientes a los folículos pilosos (Fig. 7 A), principalmente en el infundíbulo y la región prominente (Fig. 7 A, detalle).

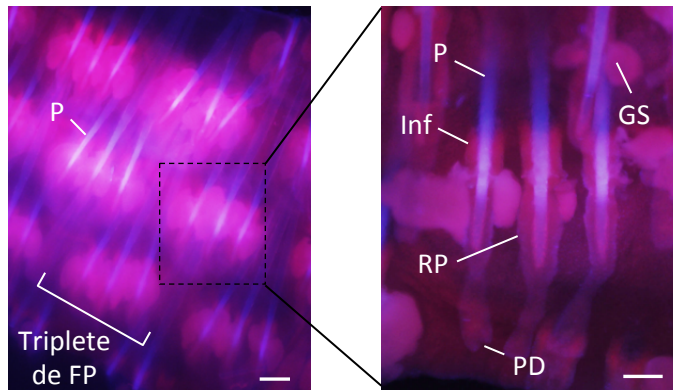
Para caracterizar la fotogeneración de ROS *in situ* en la piel y su localización en el tejido, se llevó a cabo el tratamiento *ex vivo* de la piel caudal con hidroetidina. Para ello, las muestras de piel se incubaron simultáneamente con m-ALA en solución e hidroetidina, irradiándolas a continuación con luz roja (636 nm), en paralelo con las muestras de piel control luz, únicamente expuestas a luz roja. Al reaccionar con las ROS, la hidroetidina internalizada por las células da lugar a 2-hidroxietidio, un fluorocromo que emite en la región roja del espectro y es capaz de intercalarse en los ácidos nucleicos (Wang y col., 2013). Así, el análisis de la emisión roja característica del 2-hidroxietidio permitió identificar aquellas células que habían generado ROS como consecuencia del TF. En las muestras de epidermis sometida a TF se observó una definida señal fluorescente, localizada en los núcleos de las células de la región prominente del folículo piloso (**Fig. R 7 B**), mientras que las muestras control y control luz (no incubadas con m-ALA) no presentaron emisión roja.

En conjunto, estos resultados demuestran que el TF con m-ALA en la piel del ratón constituye un procedimiento experimental que permite inducir la producción de ROS *in situ* en la región prominente del folículo piloso, principal nicho de células troncales epidérmicas.

4.2. La fotogeneración de ROS induce una proliferación transitoria en el nicho de células troncales de la región prominente del folículo piloso

Teniendo en cuenta que el TF con m-ALA induce la producción de ROS *in situ* en la región prominente del folículo piloso y que una producción limitada de ROS puede activar la proliferación celular (Chiu y Dawes, 2012), a continuación se analizó la capacidad de dicho tratamiento para activar la proliferación de este reservorio de células troncales epidérmicas. Dada su quiescencia característica, las células troncales se identificaron como LRC en función de su capacidad para retener por un período de tiempo prolongado una marca nuclear de BrdU incorporada en la cromatina. Tras el marcaje, los animales se mantuvieron hasta las 7 semanas de edad, etapa correspondiente a la segunda fase postnatal de reposo o telogén del ciclo del pelo en el ratón (Müller-Röver y col., 2001) (**Fig. 8 A**). Posteriormente, las LRC se identificaron

A



B

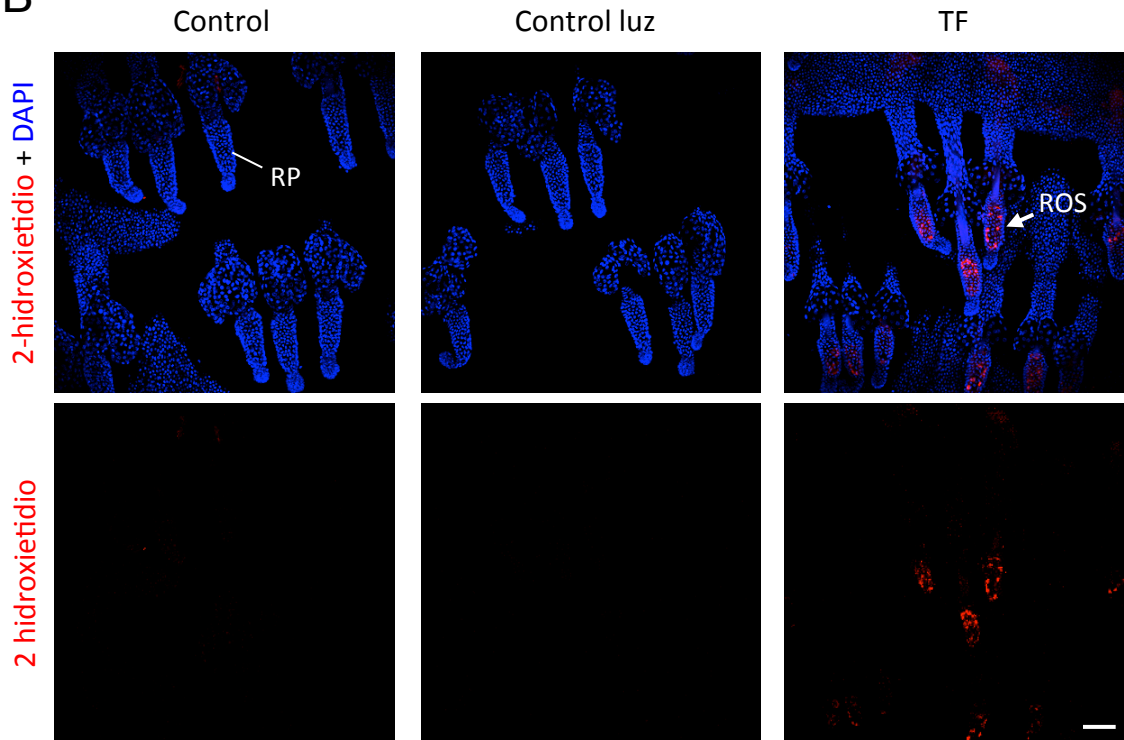


Fig. 7 | Detección de PpIX y ROS en montajes *in toto* de epidermis. A) Se demostró la producción de PpIX en la piel de la cola de los ratones tras la incubación *ex vivo* con m-ALA. La señal fluorescente roja emitida por la PpIX fue particularmente intensa en los folículos pilosos, que se disponen en tripletes en la piel caudal. La máxima producción de PpIX se detectó en el infundíbulo y en la región prominente (detalle). P: pelo; FP: folículos pilosos; Inf: infundíbulo; GS: glándula sebácea; RP: región prominente; PD: papila dérmica. Barra de escala: 100 μ m. B) La producción de ROS se demostró en la piel de la cola mediante incubación *ex vivo* con hidroetidina. La señal fluorescente correspondiente al 2-hidroxi-etidio, indetectable en la piel control (no tratada) o control luz (exclusivamente irradiada con luz roja), reveló la producción de ROS en la región prominente del folículo piloso (flecha) en la piel sometida a TF. Los núcleos se contratiñeron con DAPI. RP: región prominente; ROS: especies reactivas de oxígeno. Barra de escala: 100 μ m.

mediante inmunofluorescencia en montajes *in toto* de epidermis en muestras obtenidas a tiempos concretos después de aplicar el TF sobre la piel de la cola, en comparación con las de ratones control no tratados. La localización de las LRC correspondió a la región prominente del folículo piloso (**Fig. 8 B**), tal y como se esperaba ([Cotsarelis y col, 1990](#)). Los resultados demostraron un incremento significativo en el número de LRC en la región prominente 2 días después del TF, con respecto a las muestras control (**Fig. 8 B**). Esta estimulación fue transitoria, ya que 6 días después del estímulo no se encontraron diferencias significativas en el número de LRC (**Fig. 8 C**).

Paralelamente, y en función de los resultados previos indicando que la luz roja por sí misma no es capaz de activar la producción de ROS (**Fig. 7 B**), se analizó la proliferación de las LRC en muestras de epidermis obtenidas a partir de piel control (sin tratamiento) y control luz (exclusivamente irradiada con luz roja). No se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de muestras en el número de LRC en la región prominente de los folículos pilosos (**Fig. 8 D**). Por ello, en los experimentos subsiguientes, tanto el grupo control como el grupo control luz se tomaron indistintamente como referencia para la comparación con los animales que recibieron el TF.

Los resultados anteriores se confirmaron mediante un abordaje alternativo. Se utilizó una línea de ratón genéticamente modificada que expresa la proteína EGFP bajo el control del promotor del gen que codifica la K15, un marcador molecular enriquecido en las células troncales de la región prominente del folículo piloso ([Morris y col., 2004](#)). La cuantificación de la señal correspondiente a la expresión de EGFP mostró un incremento significativo de la misma en la región prominente del folículo piloso 2 días después del TF, en comparación con las muestras control luz (**Fig. 9 A**). Este incremento fue transitorio, ya que 6 días después del TF no se observaron diferencias con respecto a las muestras control luz (**Fig. 9 B**).

En conjunto, estos resultados demuestran que la producción de ROS *in situ* en la piel inducida por estímulo fotodinámico activa transitoriamente la proliferación en la región prominente del folículo piloso. El carácter transitorio de la respuesta al TF

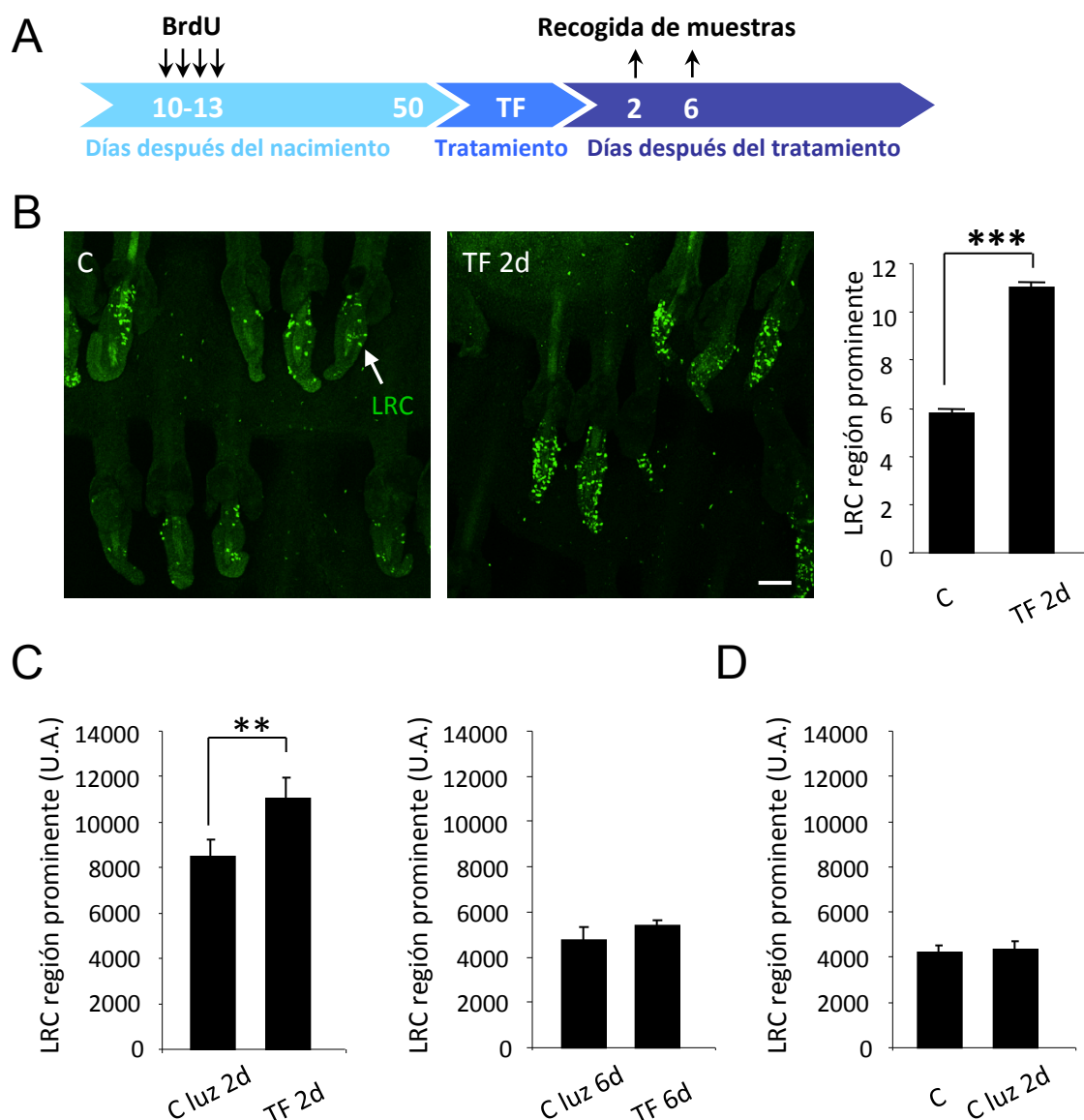


Fig. 8 | Proliferación en el nicho de células troncales del folículo piloso en respuesta al TF.

A) El esquema muestra la metodología utilizada para el marcaje e identificación de las células troncales como LRC. Los ratones neonatos recibieron inyecciones seriadas de BrdU y posteriormente, a las 7 semanas de edad y coincidiendo con la etapa de telogén, fueron sometidos a los distintos tratamientos, tras lo cual se recogió la piel de la cola a tiempos concretos. **B)** Las LRC se localizaron en la región prominente del folículo piloso mediante la detección de BrdU por inmunofluorescencia en montajes *in toto* de epidermis de la cola. Se observó un incremento significativo de LRC 2 días después del TF, en comparación con la piel control sin tratar. Se muestran las proyecciones máximas de imágenes seriadas obtenidas por microscopía confocal. Barra de escala: 100 μ m. ***, $P < 0,001$. **C)** El incremento de LRC fue transitorio, ya que se encontraron diferencias significativas a los 2 días pero no a los 6 días del TF, en comparación con las muestras control luz. **, $P < 0,05$. **D)** La cuantificación de LRC en la región prominente no mostró diferencias significativas entre las muestras control y control luz. Los gráficos representan los valores promedio \pm el error estándar para un mínimo de $n=4$ ratones por grupo.

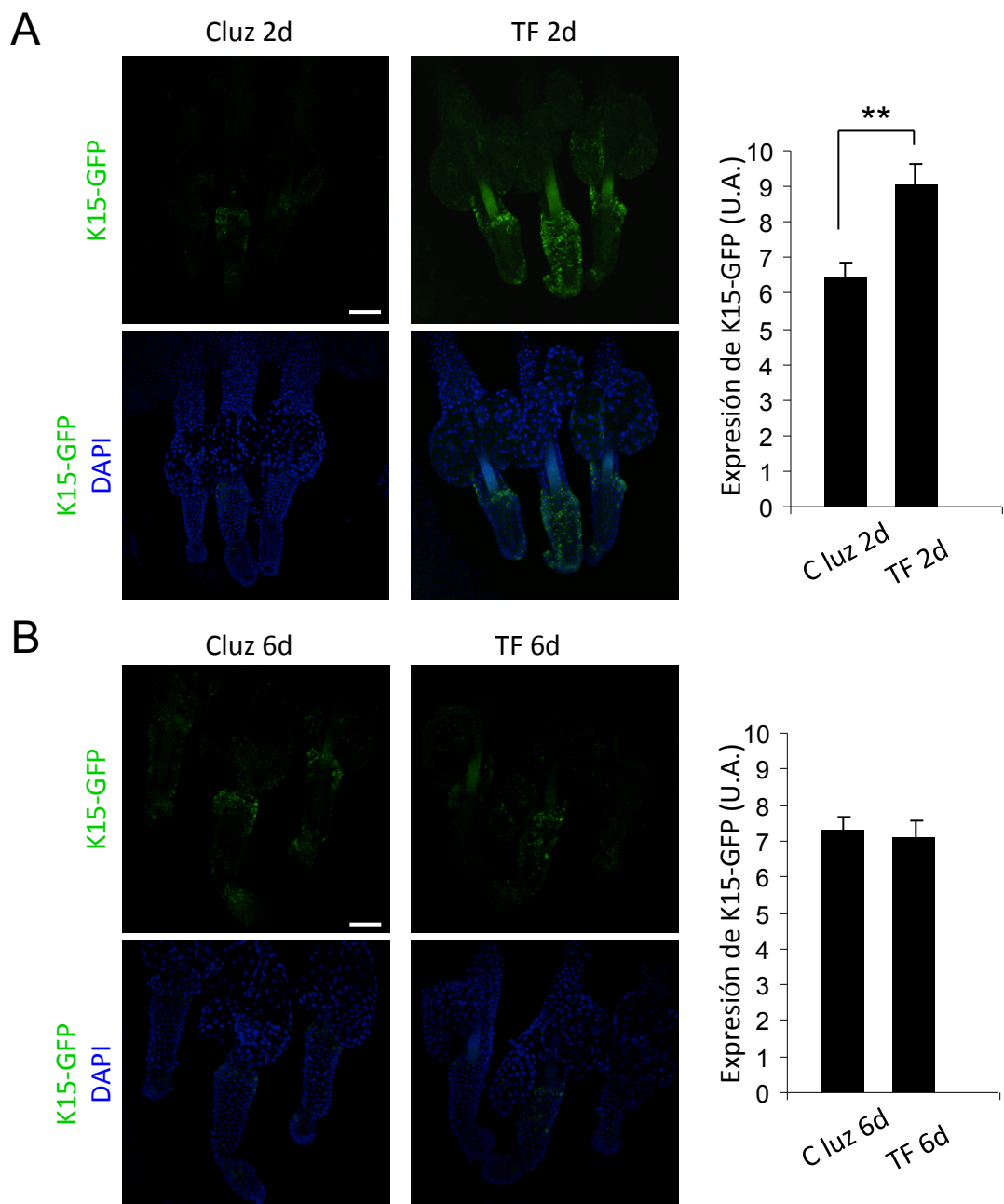


Fig. 9 | Incremento de expresión de K15 inducida por el TF. La expresión de K15, marcador de las células troncales residentes en la región prominente del folículo piloso, se analizó mediante la detección y cuantificación de la expresión de EGFP bajo el control del promotor del gen *K15*. El análisis con respecto a las muestras control luz reveló un aumento significativo en la expresión de K15-EGFP en la región prominente 2 días después del TF (**A**), sin observarse diferencias significativas a los 6 días del mismo (**B**). Se muestran las proyecciones máximas de imágenes seriadas obtenidas por microscopía confocal. Los paneles inferiores en A) y B) corresponden a la superposición de la señal de K15-EGFP y la tinción nuclear con DAPI. Barra de escala: 100 μ m. **, $P < 0,05$. Los gráficos representan los valores promedio \pm el error estándar para un mínimo de $n=4$ ratones por grupo.

sugiere que la población celular resultante de la proliferación de las células troncales en este nicho experimenta un proceso de movilización, que podría tener efectos funcionales a nivel fisiológico.

4.3. La producción de ROS inducida por el tratamiento fotodinámico promueve la hiperplasia transitoria del epitelio interfolicular

El análisis histológico de las secciones de piel dorsal del lomo teñidas con H-E (**Fig. 10 A**) y tricrómico de Masson (**Fig. 10 B**) permitió observar los cambios morfológicos inducidos por el TF. El efecto más significativo fue la inducción de una hiperplasia en la epidermis, que alcanzó el máximo espesor 2 días después de la aplicación del TF (**Fig. 10 C**). Coincidiendo con los cambios observados en el epitelio, se detectaron también diferencias en la dermis subyacente, que mostró un incremento significativo de la densidad celular 2 días después del TF con respecto a la piel control luz (**Fig. 10 C**). Durante los días posteriores, la estructura de la piel expuesta a TF revirtió gradualmente a la normalidad. Así, transcurridos 6 días no se observaron diferencias significativas en el grosor de la epidermis y en la densidad de células en la dermis, en comparación con las muestras control luz (**Fig. 10 A, C**). En torno a los 20 días desde el tratamiento, la morfología de la epidermis expuesta a TF era similar a la observada en la piel control luz.

En conjunto, estos resultados indican que la respuesta inducida en la piel por la fotogeneración de ROS también incide sobre el epitelio interfolicular, que experimenta una hiperplasia transitoria. Esto sugiere que el TF podría tener un efecto en el proceso de regeneración tisular.

4.4. La producción de ROS inducida por el tratamiento fotodinámico no produce daño genómico en la piel y no promueve la formación de tumores cutáneos a largo plazo

Para descartar cualquier tipo de daño a nivel de ADN causado por el TF, se llevaron a cabo distintos ensayos. En primer lugar, se analizó la expresión de γ -H2AX, que se produce en respuesta a la aparición de roturas de doble cadena en el ADN, de modo que la presencia de esta histona fosforilada identifica aquellos puntos de la fibra

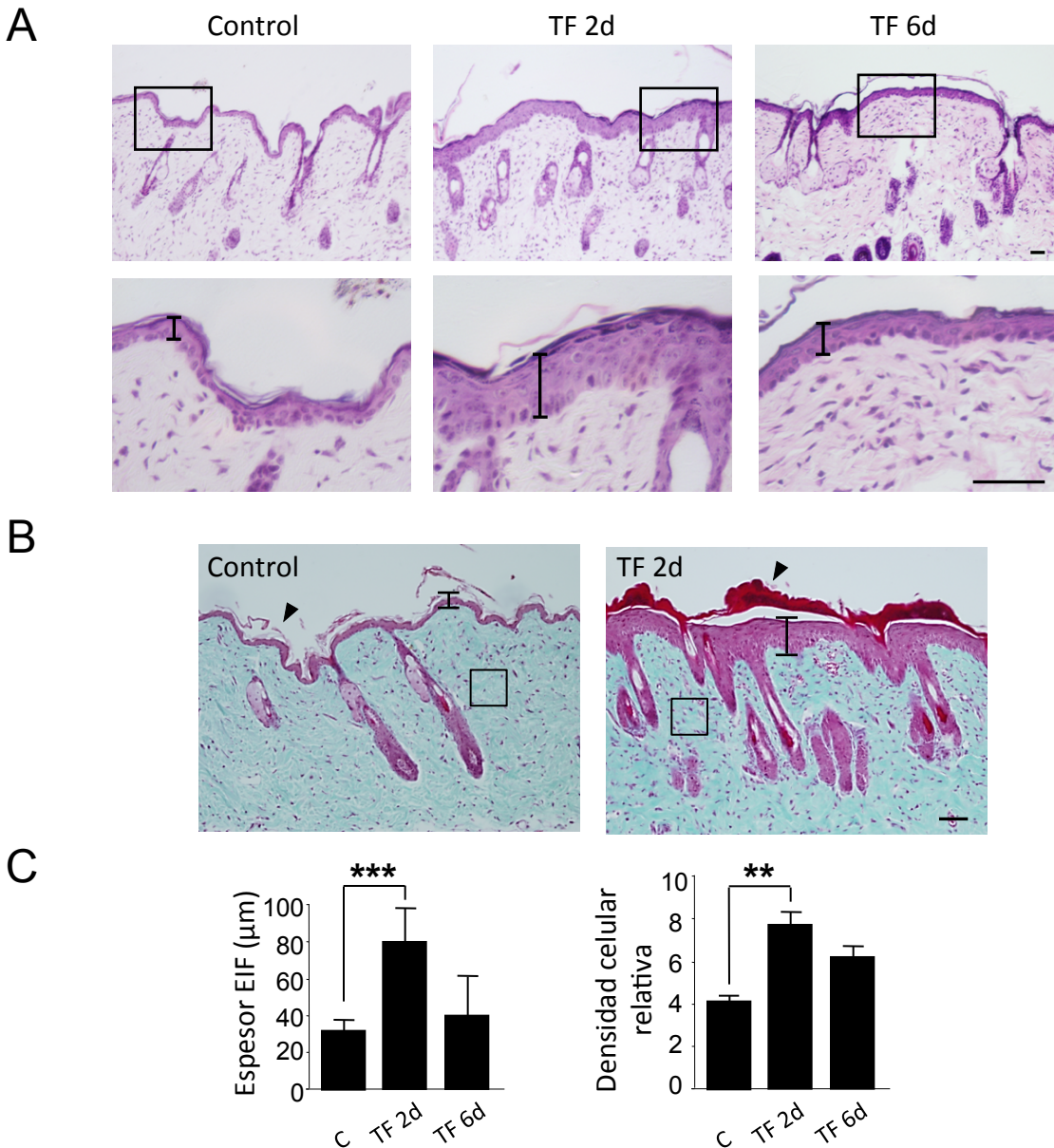


Fig. 10 | Activación transitoria de la proliferación celular en la piel en respuesta al TF. A)

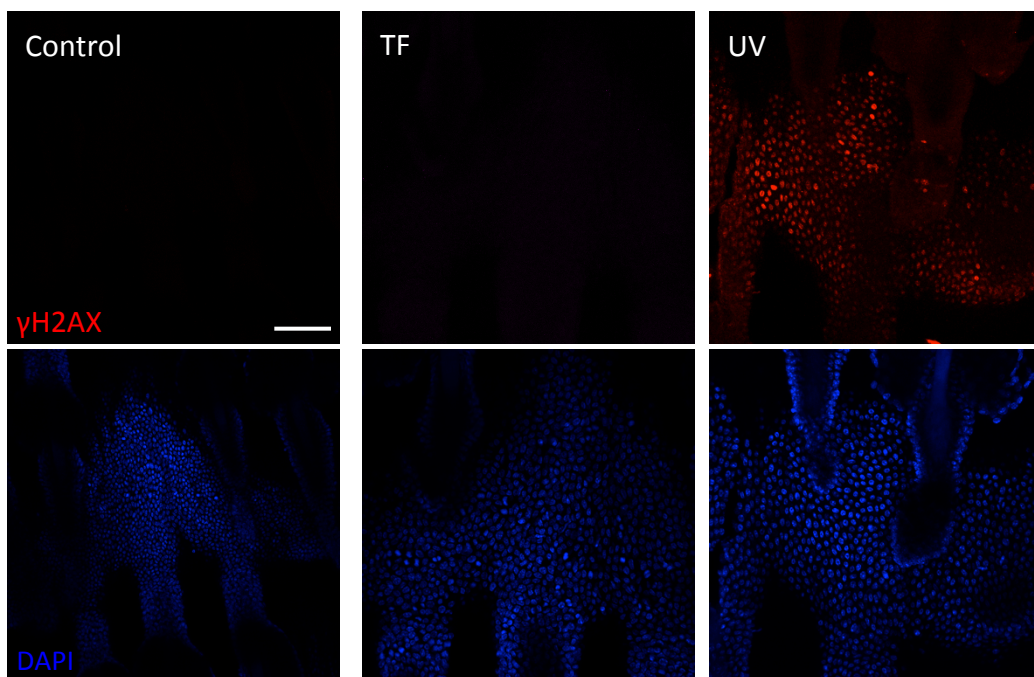
Las secciones histológicas de piel teñidas con H-E mostraron una hiperplasia del epitelio interfollicular 2 días después del TF (barras verticales). Este efecto fue transitorio, ya que el espesor normal del epitelio se recuperó prácticamente por completo a los 6 días. Las regiones recuadradas en los paneles superiores se muestran en detalle en los inferiores. **B)** Las muestras teñidas con tricrómico de Masson mostraron, además de la hiperplasia epidérmica (barras verticales), una fuerte queratinización a los 2 días del TF (cabeza de flecha), indicativa de una aceleración generalizada en la tasa de recambio epitelial. También se observó una mayor abundancia de células en la dermis (recuadros). **C)** Cuantificación del incremento transitorio del espesor de la epidermis y la densidad de células en la dermis, mostrando en ambos casos diferencias significativas 2 días después del TF con respecto a las muestras control. Se representa el promedio \pm la desviación típica. Barras de escala: 100 μ m. EIF: Epitelio interfollicular; **, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$.

de cromatina en los cuales se requiere el reclutamiento de la maquinaria de reparación (Fernandez-Capetillo y col., 2004). Además, la fosforilación de H2AX en la Ser139 está regulada en la piel del ratón por un mecanismo dependiente del ciclo del pelo, que activa este proceso durante las fases de anagén y catagén, pero no durante la telogén (Koike y col., 2007). Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia en montajes *in toto* de epidermis de la cola de los ratones indicaron que no existe inducción de γ -H2AX en respuesta al TF (Fig. 11 A). Sin embargo, se comprobó que esto tiene lugar de forma masiva tras la irradiación del tejido con luz UV (Fig. 11 A), tal y como se esperaba (Hanasoge y Ljungman, 2007). Adicionalmente se llevó a cabo un ensayo TUNEL para detectar la fragmentación de la molécula de ADN que ocurre de forma generalizada durante la apoptosis (Gavrieli y col., 1992). En todos los casos se detectó una baja proporción de células positivas en la región del bulbo piloso, sin observarse diferencias entre las muestras de piel expuesta a TF y la epidermis control no tratada (Fig. 11 B).

Finalmente, se procedió a evaluar la incidencia del estímulo de proliferación inducido por el TF en el desarrollo de tumores cutáneos a largo plazo. Para ello, se llevaron a cabo sendos experimentos aplicando sobre la piel dorsal del lomo y la cola un único TF (n=5 ratones) o dos tratamientos consecutivos espaciados 15 días en el tiempo (n=3 ratones). El seguimiento de los animales se prolongó por un plazo de 18 meses, sin detectarse indicio alguno de la aparición de tumores en la piel.

En conjunto, estos resultados demuestran que el TF no induce muerte o daño celular en el tejido. Esto indica que la proliferación transitoria de las células troncales en la región prominente es una respuesta celular intrínseca, que no ocurre como consecuencia de la necesidad de reemplazar células dañadas. Además, los resultados demuestran que la proliferación tiene lugar de forma controlada, ya que el TF no promueve la aparición de tumores a largo plazo.

A



B

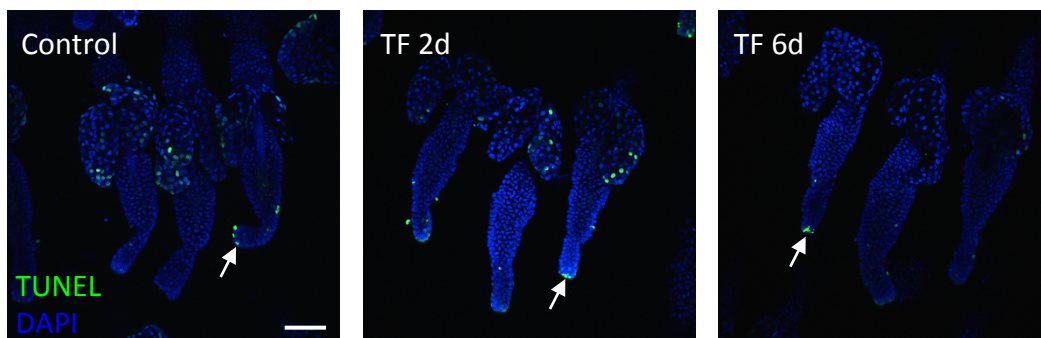


Fig. 11 | Análisis de marcadores de daño al ADN. A) No se detectó expresión de γ H2AX en las muestras de epidermis control y 2 días después del TF, a diferencia del elevado número de núcleos marcados en el epitelio interfolicular en las muestras obtenidas a partir de piel irradiada con luz UV de 312 nm. **B)** Detección de células apoptóticas mediante el ensayo TUNEL. Tanto las muestras control como las obtenidas 2 y 6 días tras el TF presentaron una baja proporción de núcleos positivos (flecha), localizados principalmente en la región del bulbo piloso. No se observaron diferencias entre los distintos grupos, así como tampoco se detectó marcaje en la región prominente. En todos los casos se muestran imágenes de microscopía confocal (proyecciones máximas) de montajes *in toto* de epidermis de la cola, utilizando contratinción nuclear con DAPI. Barra de escala: 100 μ m.

4.5. La activación del nicho de células troncales del folículo piloso mediante la fotogeneración de ROS promueve el crecimiento del pelo

Una vez demostrado que la producción transitoria de ROS *in situ* inducida por el TF en la piel está asociada a una activación del nicho de células troncales del folículo piloso, se analizaron los potenciales efectos fisiológicos de este proceso en el tejido. En primer lugar, se caracterizó la capacidad del TF para modular el ciclo de crecimiento del pelo. La rasuración capilar funciona como estímulo que activa o acelera el crecimiento del pelo en ratones adultos (Borum, 1958). No obstante, a las 7 semanas de edad, los ratones C57BL/6j se encuentran en la subfase de telogén refractaria correspondiente al segundo ciclo postnatal de crecimiento del pelo. Esto implica una fuerte señalización inhibitoria, que mantiene al folículo piloso insensible a estímulos promotores de la entrada en la fase de anagén hasta que se produce la transición a la telogén competente (Plikus y col., 2008). Para caracterizar las posibles diferencias en el ritmo de crecimiento del pelo debidas al TF, se establecieron dos regiones independientes en la piel dorsal del lomo de cada ratón separadas por la línea media en el eje longitudinal, siguiendo el mismo esquema utilizado en los experimentos anteriores. Una vez rasuradas ambas zonas, se aplicó tópicamente m-ALA sobre la piel del lado derecho y se confirmó la producción diferencial de PpIX (**Fig. 12 A**). A continuación se irradió la región dorsal del animal con luz roja, quedando la mitad izquierda como control luz y la derecha como piel expuesta al TF completo. En estas condiciones, se observó una fuerte aceleración del crecimiento del pelo inducida por el TF (**Fig. 12 A**). Esta respuesta fisiológica resultó inhibida por el compuesto antioxidante NAC (**Fig. 12 B**), demostrando la implicación causal de las ROS generadas en el proceso de estimulación. En los días subsiguientes se observó que, en ausencia de NAC, la piel expuesta al TF se tornó grisácea —indicando la transición a la fase de anagén— y terminó por cubrirse completamente de pelo. Sin embargo, la región de piel control luz mostró una ausencia completa de pelo, manteniendo la coloración rosácea propia de la telogén (**Fig. 12 A**). De acuerdo con estas observaciones, el análisis histológico de las muestras de piel obtenidas al término del experimento indicó la progresión del ciclo de crecimiento del pelo hacia la fase de anagén promovida por el TF. Así, se observó un

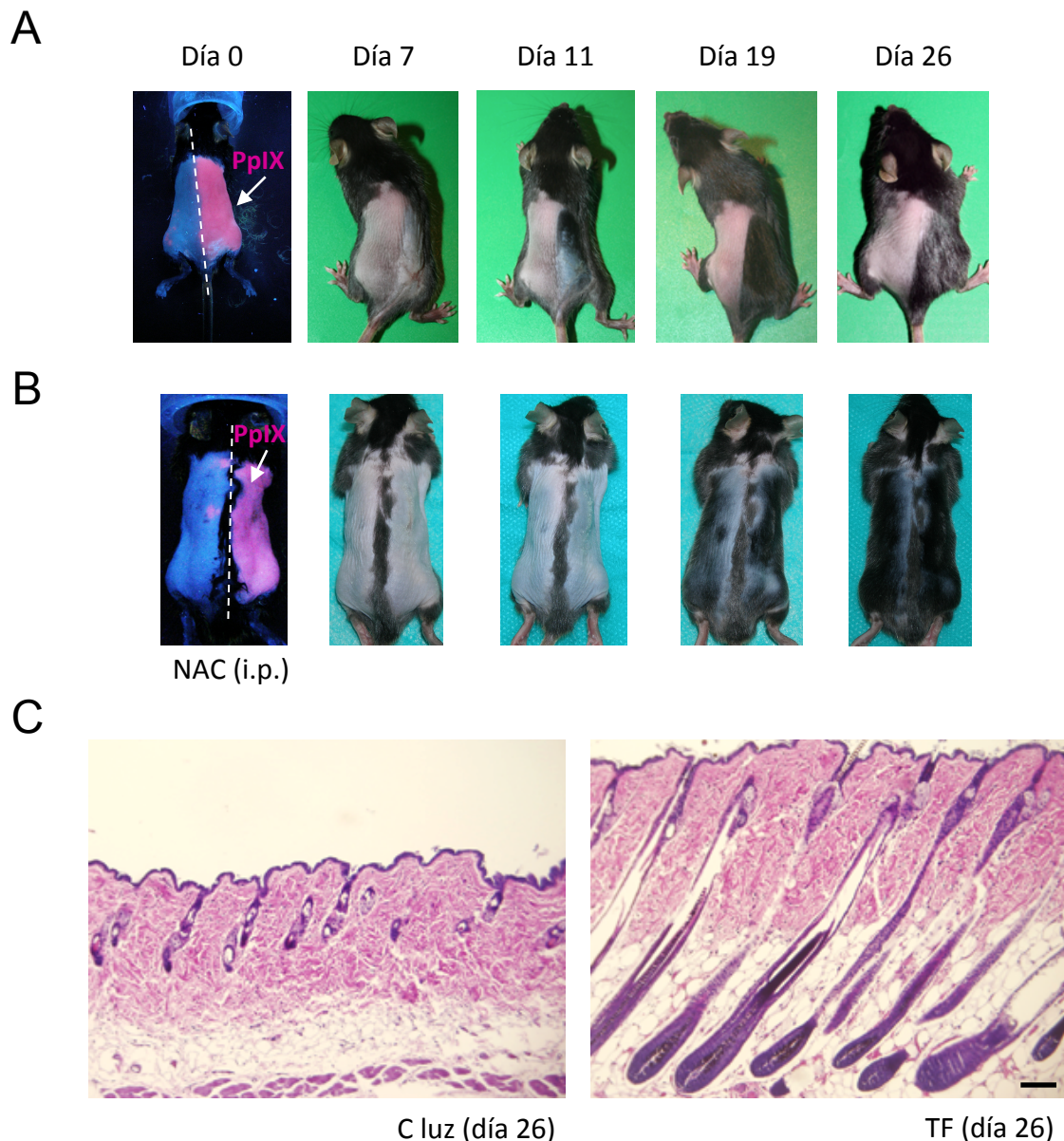


Fig. 12 | Inducción del crecimiento del pelo en respuesta al TF. **A)** La piel de la mitad derecha del lomo emitió fluorescencia roja bajo luz de 407 nm, indicando la producción de PpIX tras la incubación con m-ALA (Día 0). Tras la irradiación, se observó una aceleración del crecimiento del pelo en el área sometida al TF (derecha), con respecto a la región de piel control luz (izquierda) (Días 7 a 26). **B)** El TF en estas mismas condiciones no indujo diferencias en el ritmo de crecimiento del pelo entre ambas regiones de piel en ratones tratados con el compuesto antioxidante NAC. **C)** El análisis histológico de las muestras de piel recogidas al final del experimento y teñidas con H-E mostró el desarrollo de los folículos pilosos en la fase de anágén como consecuencia del TF, a diferencia de los folículos en telogén presentes en la piel control luz. Barra de escala: 200 μ m.

amplio desarrollo de la porción cíclica de los folículos en respuesta al TF, penetrando en profundidad a través la dermis hasta alcanzar la hipodermis, a diferencia de la piel control luz, que presentaba la mayoría de sus folículos pilosos en telogén (**Fig. 12 C**).

Estos resultados demuestran que una producción transitoria de ROS *in situ* en la piel activa y acelera el crecimiento del pelo, evadiendo la señalización inhibitoria que existe durante la fase de telogén refractaria. Asimismo, indican que el TF no solo es capaz de inducir la activación de las células troncales epidérmicas residentes en la región prominente, sino también su movilización hacia la región del bulbo piloso, donde la progenie celular resultante se diferencia para contribuir al crecimiento del pelo.

4.6. La producción endógena de ROS inducida por el tratamiento fotodinámico promueve el proceso de regeneración tisular en la piel

Los cambios morfológicos y funcionales observados en la piel como consecuencia del TF pueden deberse a la contribución de un proceso de movilización de las células troncales foliculares, a la activación de la capa basal del propio epitelio interfolicular o a ambas. En cualquier caso, aunque las distintas poblaciones de células troncales epidérmicas funcionan de forma independiente en situación de reposo, ambas pueden ser reclutadas para la reparación epitelial cuando el tejido resulta dañado (Levy y col., 2005; Clayton y col., 2007; Levy y col., 2007; Page y col., 2013). En este sentido, la estimulación del nicho de células troncales del folículo piloso debida a la generación endógena y transitoria de ROS provocada por el TF podría promover los procesos de reparación o regeneración tisular en respuesta a un daño provocado en el tejido.

Para contrastar esta hipótesis, se utilizó un modelo de quemadura en la piel de los ratones. Al día siguiente de la generación de las quemaduras, se aplicó m-ALA sobre la región afectada y los márgenes limitantes. La máxima producción de PpIX tras la incubación con m-ALA se detectó en el tejido sano alrededor de la lesión, mientras que no se observó acumulación de PpIX en los animales control, que no recibieron la aplicación de m-ALA sobre la quemadura (**Fig. 13 A**). Todos los ratones fueron

posteriormente irradiados con luz roja, con el fin de establecer las comparaciones en el proceso de cicatrización entre los animales expuestos al TF y el grupo control luz. En todos los casos se observó el desarrollo de una costra sobre la región lesionada durante los días subsiguientes al tratamiento. Sin embargo, el proceso de cicatrización mostró un progreso significativamente acelerado como consecuencia del TF, especialmente a partir del día 9 desde la aplicación del mismo. Transcurridos 17 días se había completado la regeneración en el grupo expuesto a TF, en contraste con los animales control luz, que aún mostraban una región lesionada sin reparar (**Fig. 13 B, C**). La cuantificación de la evolución temporal de la superficie de la región afectada por la quemadura y el análisis del área bajo la curva resultante al final del experimento demostraron la existencia de diferencias significativas entre ambos grupos (**Fig. 13 C**).

Adicionalmente, la proliferación celular en respuesta al TF en la región de epidermis circundante a las quemaduras se analizó mediante inmunohistoquímica en cortes de piel. Para ello, los ratones recibieron inyecciones puntuales de BrdU durante el tiempo comprendido entre el tratamiento y la recogida de muestras, con el fin de marcar las células proliferantes por medio de la incorporación del análogo de nucleótido en su ADN. En concordancia con los resultados previos, se observó una inducción de proliferación celular en la región prominente de los folículos pilosos como consecuencia del TF (**Fig. 13 D**).

En conjunto, estos resultados indican que el TF promueve la cicatrización de las lesiones por quemadura en la piel de los ratones, demostrando la contribución de las células de la región prominente del folículo piloso al proceso de regeneración tisular.

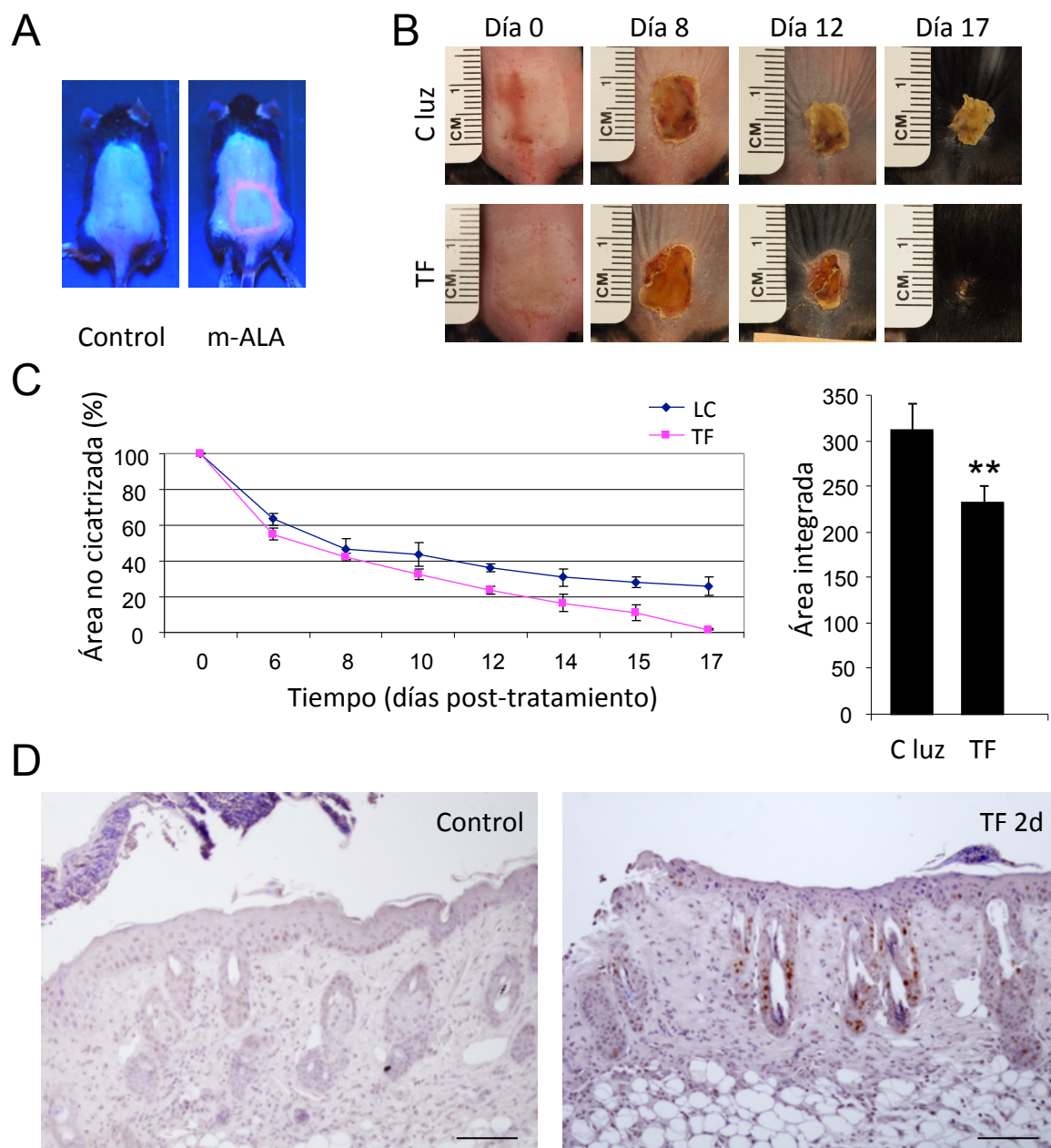


Fig. 13 | Aceleración de la regeneración de quemaduras por TF. **A)** Tras la incubación con m-ALA, la piel circundante a la quemadura emitió una intensa señal fluorescente roja bajo luz de 407 nm, que reveló la producción de PpIX. La piel control no mostró señal. **B)** Todos los animales desarrollaron inicialmente una costra similar. El TF aceleró el proceso de cicatrización, que se completó a los 17 días (paneles inferiores), a diferencia de las quemaduras control luz (paneles superiores). **C)** Las curvas de evolución temporal del área afectada por la lesión, cuantificada a partir de imágenes digitales, incrementaron su separación a partir del día 9. El gráfico de barras representa el promedio \pm el error estándar del área bajo la curva calculada para un mínimo de $n=4$ ratones por grupo. **, $P<0,06$. **D)** Las células en proliferación se marcaron mediante la incorporación de BrdU tras la aplicación del TF. El análisis mediante inmunohistoquímica en secciones histológicas de piel permitió identificar un mayor número de células proliferantes en la región prominente de los folículos pilosos de la zona limitante con la quemadura 2 días después del TF, en comparación con las muestras control. Barra de escala: 100 μ m.

4.7. La estimulación de la piel en respuesta a la fotogeneración de ROS está asociada a la activación de c-Src, pero no a la acumulación citoplasmática y translocación nuclear de β -catenina

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se procedió a investigar los mecanismos moleculares subyacentes a la estimulación de la homeostasis cutánea en respuesta al TF. Para ello, se analizó la expresión y los niveles de fosforilación de diferentes proteínas. Se seleccionaron para este análisis proteínas cuya regulación por mecanismos redox es conocida, así como componentes clave de distintas rutas de señalización importantes en la regulación de la activación del crecimiento del pelo y de la función de las células troncales epidérmicas, incluyendo las vías Wnt/ β -catenina, ERK/MAPK y PI3K/AKT (Lee y Tumber, 2012; Bito y Nishigori, 2012; Ciu y Dawes, 2012). Para ello, se tomaron muestras de piel 2 y 6 días después de la aplicación del TF, junto con las correspondientes muestras de piel control luz, y se analizaron los niveles de expresión y localización en la piel de distintas proteínas mediante inmunofluorescencia e inmunoblot.

La proteína β -catenina juega un papel central en la activación del crecimiento del folículo piloso (Lei y col., 2013). Sorprendentemente, no se encontraron cambios en los niveles globales de expresión de β -catenina total en la piel ni de su forma metabólicamente estable y susceptible de ser translocada al núcleo (β -catenina activa) (Fig. 14). Tampoco se observaron diferencias en su localización, mayoritariamente asociada a la membrana plasmática, sin observarse acumulación citoplasmática o translocación nuclear en los queratinocitos del epitelio interfolicular o del folículo piloso (Fig. 15 A), indicadores esenciales de la activación funcional de la ruta Wnt/ β -catenina (Jamieson y col., 2012). Del mismo modo, tampoco se mostraron modificados en respuesta al TF los niveles de expresión de proteínas de la familia MAPK, incluyendo p44/42 (ERK1/2), JNK y p38, así como de sus formas fosforiladas en residuos críticos de Thr/Tyr indicadores de activación funcional (Bartosz, 2009) (Fig. 14).

Por el contrario, y de forma consistente con resultados previos (Blázquez-Castro y col., 2012), 2 días después de la aplicación del TF se observó un

incremento transitorio en los niveles de fosforilación de c-Src en el residuo Tyr416, indicador de su activación funcional. Trascurridos 6 días desde el tratamiento, estos niveles fueron comparables a los observados en las muestras control luz (**Fig. 14**). El análisis de la distribución de c-Src en la piel mostró una acumulación de esta proteína en la capa basal del epitelio hiperplásico y en los folículos pilosos 2 días después del TF (**Fig. 15 B**), coincidiendo con su activación por fosforilación. También de forma consistente con resultados previos ([Le Belle y col., 2011](#)), se observó un incremento transitorio en la fosforilación de la proteína Akt, también llamada proteína quinasa B (*protein kinase B*, PKB) indicador de la activación funcional de la vía PI3K/Akt/mTOR (**Fig. 14**).

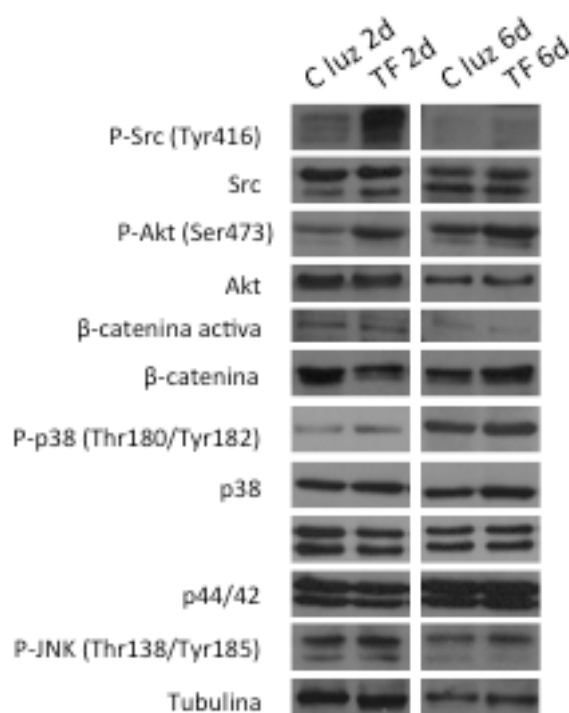
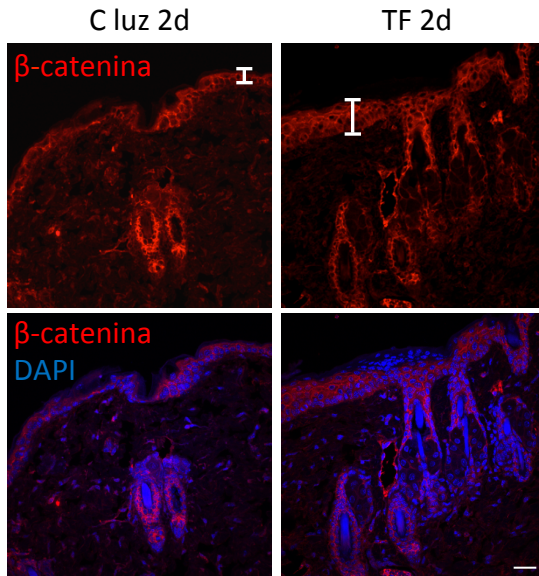


Fig. 14 | Caracterización de cambios en los niveles de expresión y modificaciones postraduccionales de proteínas en la piel inducidos por el TF. El análisis mediante inmunoblot a partir de muestras tomadas 2 días después del TF mostró un incremento transitorio en la expresión de las formas fosforiladas y activas de Src y AKT, en comparación con los niveles de expresión basal correspondientes a las muestras control luz. Los niveles de expresión totales de ambas proteínas se mantuvieron constantes. La expresión de β-catenina y de su forma metabólicamente estable (β-catenina activa) no variaron en respuesta al tratamiento. También se analizaron los niveles de expresión de las MAPK p38, p42/44 y JNK, así como sus formas fosforiladas y activas, sin observarse cambios en la expresión o en las modificaciones postraduccionales de ninguna de ellas. A los 6 días del TF no se observaron diferencias en la expresión de ninguna de las proteínas analizadas. Como control de carga se utilizó tubulina.

A



B

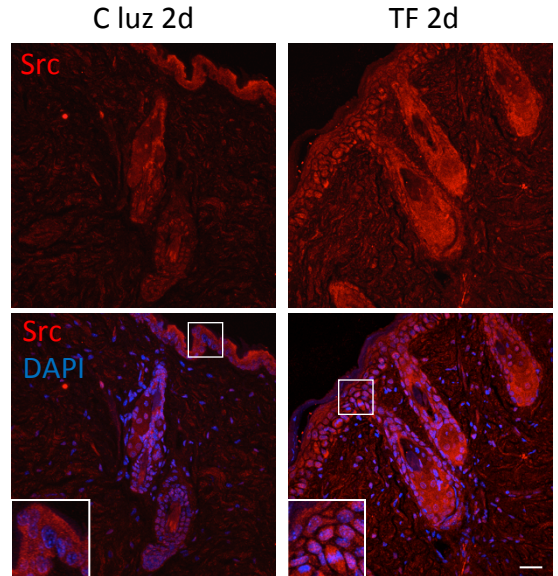


Fig. 15 | Análisis de la expresión y localización de β -catenina y c-Src en la piel. Los patrones de expresión de β -catenina y c-Src se analizaron mediante inmunofluorescencia en secciones histológicas de piel del lomo recogida 2 días después del TF, en comparación con muestras de piel control luz. Los núcleos se tiñeron con DAPI. **A)** Los niveles de expresión y la distribución de β -catenina fueron similares en ambos tipos de muestras, así como su localización asociada a la membrana plasmática de los queratinocitos en el epitelio interfolicular y los folículos pilosos. **B)** La señal correspondiente a la expresión de c-Src se incrementó significativamente 2 días después del TF, observándose una acumulación de esta proteína en los queratinocitos basales del epitelio hiperplásico y en los folículos pilosos. Se muestran las proyecciones máximas de imágenes seriadas representativas obtenidas por microscopía confocal. Barra de escala: 100 μ m.

En conjunto, estos resultados sugieren que la estimulación del nicho de células troncales del folículo piloso inducida por la producción transitoria de ROS tiene lugar a través de la activación de c-Src y AKT, mientras que la señalización Wnt/ β -catenina no parece estar implicada en este proceso.

4.8. La generación transitoria de ROS debida al tratamiento fotodinámico induce un cambio definido en el patrón de expresión génica global de la piel

Con el objetivo de caracterizar los cambios moleculares en el patrón de expresión génica inducidos en la piel por el estímulo de producción de ROS, se llevó a cabo un análisis de expresión transcripcional a gran escala usando micro-matrices (*micro-arrays*). Estos resultados (material suplementario digital) se encuentran actualmente en proceso de incorporación a la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). La **Tabla 3** recoge una selección de genes cuya expresión resultó significativamente modificada (activada o reprimida) 2 días después del TF, simultáneamente en la piel dorsal del lomo y en la epidermis de la cola, con respecto a los niveles observados en las muestras control. Los resultados obtenidos indicaron que el TF con m-ALA induce significativamente la expresión de genes implicados en la activación de la proliferación celular y genes que codifican marcadores de células troncales epidérmicas (*Prl2c*, *Kgf*, *S100A*), mientras que reprime la expresión de genes asociados a la regulación del programa de diferenciación y el equilibrio entre proliferación y diferenciación en la piel y el folículo piloso (*c-myc*, *Notch2*). El mayor incremento en el ratio de expresión transcripcional se observó para la activación del gen *Prl2c3*, cuyo producto corresponde a una proteína secretada de tipo hormona perteneciente a la superfamilia 2 subfamilia c de la prolactina. En conjunto, los resultados obtenidos de este análisis sugieren que una producción local y transitoria de ROS en la piel induce un microambiente de señalización que promueve la proliferación en el nicho de células troncales.

Gen	Nº acceso GenBank	Ratio de expresión	Funciones asociadas
<i>Prl2c3</i>	NM_011118	(+) 144,93	Perteneciente a la familia prolactina. Posible papel en cicatrización de heridas y ciclo del pelo.
<i>Gsta4</i>	NM_010357	(+) 21,24	Cataliza la conjugación de glutatión reducido con numerosos electrófilos exógenos y endógenos.
<i>Hip1</i>	NM_146001	(+) 16,78	Unión a actina. Participa en tráfico y endocitosis mediada por clatrina. Posible papel en diferenciación, proliferación y/o supervivencia de progenitores somáticos y germinales.
<i>Sox5</i>	NM_011444	(+) 11,73	FT implicado en el establecimiento de linajes celulares durante el desarrollo.
<i>Fgf7 (Kgf)</i>	NM_008008	(+) 4,40	Factor de crecimiento activo en queratinocitos. Papel en regulación de la proliferación y diferenciación celular.
<i>Lef1</i>	NM_010703	(+) 3,81	Participa en la señalización Wnt. Posible papel en diferenciación celular en el pelo y morfogénesis del folículo piloso.
<i>Lrp1</i>	NM_008512	(+) 3,15	Receptor endocítico implicado en endocitosis y fagocitosis de células apoptóticas. Puede modular procesos de señalización intracelular dependiente de quinasas.
<i>Tln2</i>	NM_001081242	(+) 3,11	Componente principal de las placas de adhesión focal (unión integrinas-actina). Recluta y activa a PIP5K1C.
<i>Gapdh</i>	NM_008084	(+) 3,07	Actividad enzimática gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa y nitrosilasa. Papel en glucolisis y funciones nucleares, respectivamente.
<i>Myh4</i>	NM_010855	(+) 2,79	Contracción muscular
<i>Fgf18</i>	NM_008005	(+) 2,38	Papel en regulación de la proliferación, diferenciación y migración celular. Estimula proliferación en hígado e intestino.
<i>Cdh11</i>	NM_009866	(-) 2,62	Proteína de adhesión dependiente de calcio (interacciones homofílicas).
<i>Bmp2</i>	NM_007553	(-) 3,14	Induce formación de cartílago y hueso.
<i>Notch2</i>	NM_010928	(-) 3,14	Receptor de membrana de los ligandos Jagged1, Jagged2 Y Delta1. Regula la determinación del destino celular.
<i>Rora</i>	NM_013646	(-) 3,16	Receptor nuclear. Unión a ADN, regula genes implicados en metabolismo lipídico, desarrollo del cerebelo y de fotorreceptores, ritmos circadianos y desarrollo del músculo esquelético.
<i>Myc</i>	NM_010849	(-) 3,31	FT implicado en la señalización Wnt. Regulación de la proliferación y diferenciación celular.
<i>Mest</i>	NM_008590	(-) 4,31	Hidrolasa perteneciente a la superfamilia AB. Expresión en tejidos mesodérmicos. Implicada en metabolismo lipídico y del ácido retinoico.
<i>Pcaf</i>	AF254442	(-) 4,35	Función histona acetiltransferasa (HAT). Promueve la activación transcripcional.
<i>Ikzf4</i>	NM_011772	(-) 5,03	Unión a ADN, reconoce la secuencia Ikaros (5'GGGAATGCC-3'). Interacciona con CTBP2, SPI1 y MITF.

Tabla 3 | Cambios en el patrón de expresión génica a gran escala inducidos en la piel por el TF. Grupo representativo de genes cuya actividad transcripcional se modifica significativamente, activándose (+) o reprimiéndose (-), 2 días después del TF con respecto a los correspondientes controles, tanto en piel dorsal del lomo como en la epidermis de la cola. Funciones extraídas de UniProt KB. FT: factor de transcripción.

Con objeto de validar los datos resultantes del análisis previo a gran escala, se seleccionó un conjunto de genes de interés cuyos niveles de expresión se analizaron mediante qRT-PCR (**Fig. 16**). Para ello, se utilizaron muestras de piel dorsal del lomo recogidas 2 y 6 días después de la aplicación del TF, en comparación con los niveles basales de expresión detectados en las muestras de piel control luz. Los resultados obtenidos confirmaron la activación transcripcional significativa y elevada de genes como *Prl2c3* y *S100A8* a los 2 días del TF (**Fig. 16 A**). A los 6 días, la expresión de estos genes retornó a niveles comparables a los observados en las muestras control (**Fig. 16 B**). Asimismo, los resultados demostraron también la represión de la expresión del gen *c-myc* inducida por el TF (**Tabla 3, Fig. 16**). La transcripción de genes diana de la ruta de señalización Wnt/ β -catenina, como *Jag1*, *Ovol1* y *Axina2*, mostró una represión significativa 2 días después del TF (**Fig. 16 A**), recuperando niveles normales a los 6 días (**Fig. 16 B**).

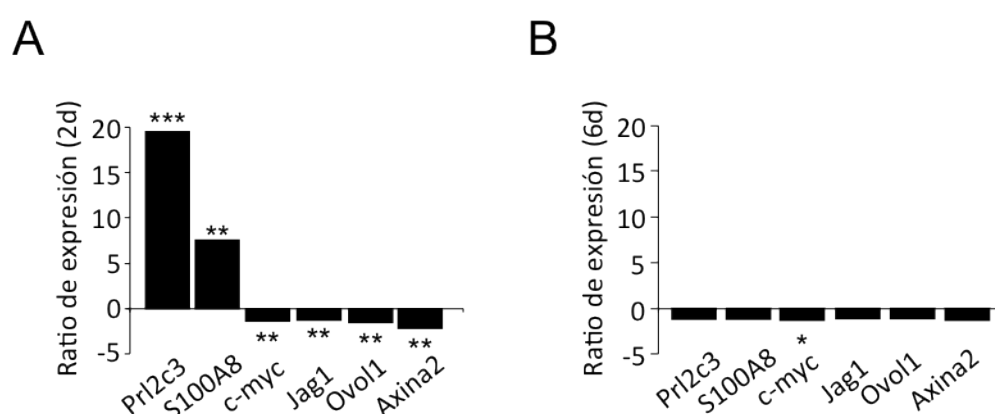


Fig. 16 | Caracterización y validación de los cambios de expresión génica inducidos por el TF. Cuantificación relativa de la expresión de ARNm de los genes indicados, analizada mediante qRT-PCR. El ratio de expresión representado corresponde al cociente entre los niveles de expresión transcripcional detectados en las muestras de piel dorsal del lomo recogidas 2 días (**A**) o 6 días (**B**) después del TF y las muestras de piel control luz paralelamente obtenidas en cada caso. Como control endógeno se tomó la expresión del ARN ribosómico 18S. Los asteriscos indican la significación estadística obtenida mediante la comparación entre los valores medios de $2^{-\Delta Ct}$ de ambos grupos (*** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,05$, * $P \leq 0,1$).

En conjunto, estos resultados sugieren que la producción transitoria de ROS en respuesta al TF en la piel modula la expresión de numerosos genes implicados en la activación de la proliferación en el compartimento de células troncales y en su nicho,

pero no está implicada en la regulación de la expresión de genes relacionados con la señalización mediada por la ruta Wnt/ β -catenina.

4.9. La generación de ROS promovida por el tratamiento fotodinámico induce transitoriamente la translocación nuclear de Prl2c3 en las células de la epidermis

Teniendo en cuenta la potente activación transitoria a nivel de transcripción del gen *Prl2c3* inducida por el TF con m-ALA, se analizaron los patrones de expresión y distribución de la proteína codificada por este gen en cortes histológicos de la piel dorsal del lomo. Las comparaciones se establecieron entre ambas regiones de piel (control luz y expuesta al TF) de cada animal, incluyendo muestras recogidas tanto 2 como 6 días después de los tratamientos. Los resultados obtenidos demostraron un incremento en la expresión de Prl2c3 en la piel 2 días después del TF con respecto a la piel control luz (**Fig. 17 A, B, C**), igualándose los niveles a los 6 días (**Fig. 17 D**). Este incremento de expresión se detectó tanto a nivel de la dermis, donde esta proteína se localizó fundamentalmente en el citoplasma de los fibroblastos, como en el epitelio interfolicular y los folículos pilosos (**Fig. 17 A, C**). Sorprendentemente, el incremento de expresión observado en los queratinocitos del epitelio interfolicular hiperplásico y la región infundibular de los folículos pilosos se vio acompañado de una definida localización nuclear de la proteína que no ha sido descrita previamente (**Fig. 17 B, C**). Esta observación sugiere que Prl2c3 podría jugar un papel novedoso en el control de la expresión de genes implicados en la activación de la proliferación y del mantenimiento homeostático en la piel.

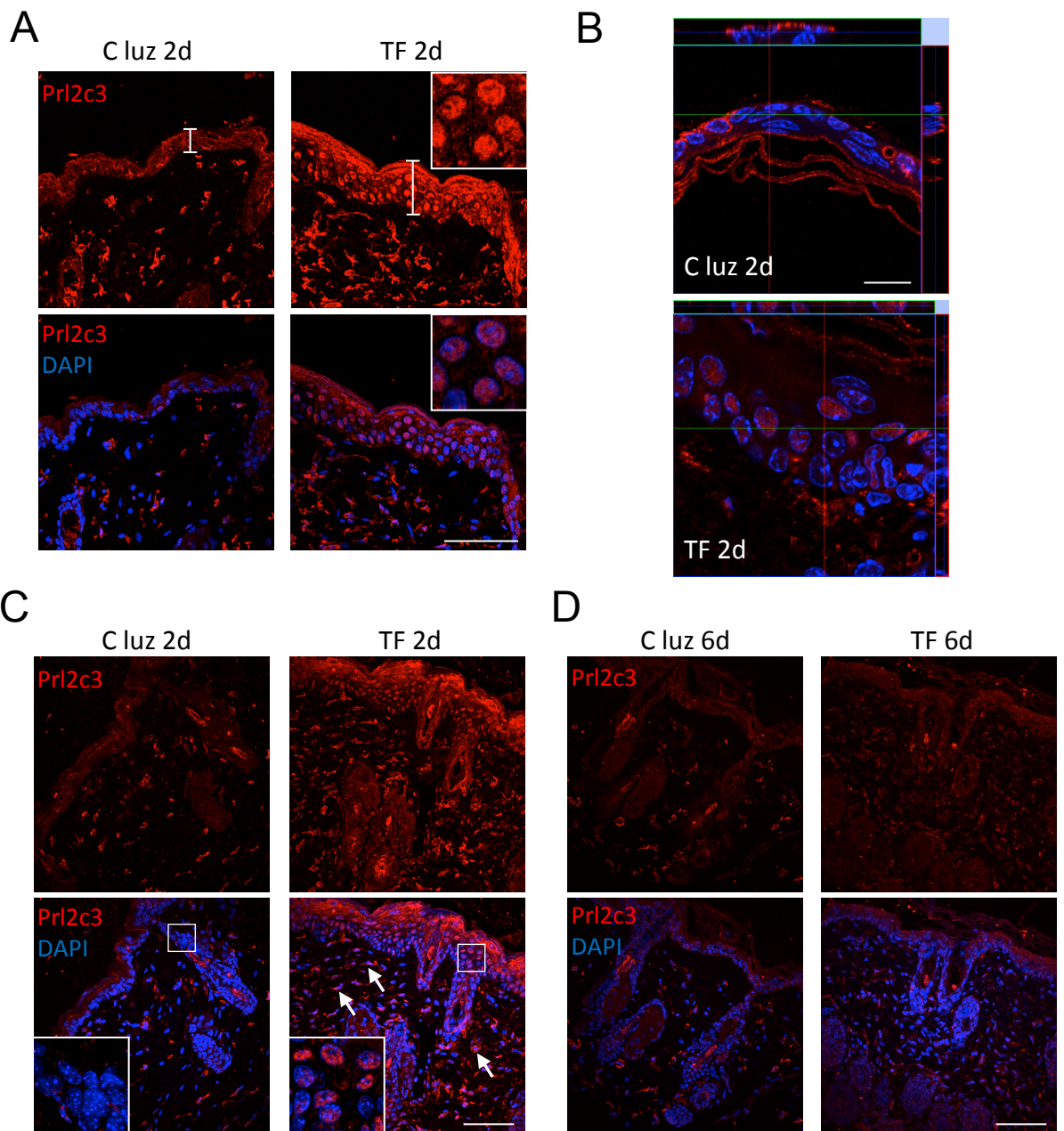


Fig. 17 | Efecto del TF sobre la expresión y localización de Prl2c3 en la piel. El patrón de expresión de la proteína Prl2c3 se analizó mediante inmunofluorescencia en cortes histológicos de piel dorsal del lomo y tinción nuclear con DAPI. **A)** El TF indujo un fuerte incremento de la expresión de Prl2c3 en el epitelio interfollicular a los 2 días, en comparación con los bajos niveles observados en las muestras control luz. El detalle muestra la localización nuclear de Prl2c3 en todos los estratos del epitelio hiperplásico (barra de escala: 20 μ m). **B)** Imágenes correspondientes a un único plano, que confirman la localización nuclear de Prl2c3 en los queratinocitos 2 días después del TF. Se muestran las proyecciones ortogonales (margen superior y lateral derecho) de los planos indicados. **C)** El incremento de los niveles de Prl2c3 a los 2 días del TF se observó también en el citoplasma de los fibroblastos de la dermis (flechas), así como en los folículos pilosos, mostrando una evidente translocación nuclear en las células epiteliales de la región infundibular (detalle). **D)** A los 6 días del TF, la expresión de Prl2c3 recuperó el patrón de distribución y los niveles observados en las muestras de piel control luz. A), C) y D) corresponden a proyecciones máximas de imágenes seriadas. Barras de escala: 100 μ m.

V. Discusión

La piel es un sistema experimental idóneo para el estudio *in vivo* de las células troncales adultas, constituyendo, asimismo, un modelo biológico excelente y ampliamente utilizado para la implementación de nuevas aproximaciones terapéuticas en medicina regenerativa y en biotecnología. Los folículos pilosos constituyen un componente esencial de la piel de los mamíferos. Gran parte del interés científico por su arquitectura y biología se debe a su capacidad regenerativa a lo largo de sucesivos ciclos de crecimiento y a las distintas poblaciones de células troncales, caracterizadas por la expresión enriquecida de diferentes marcadores moleculares, que se encuentran parcialmente superpuestas formando parte de esta estructura (Jaks y col., 2010). La región prominente del folículo piloso constituye un microambiente molecular en el que se inhibe la diferenciación celular, proporcionando un nicho idóneo para estas poblaciones de células troncales adultas, que pertenecen a diversos linajes (principalmente epitelial y melanocítico) (Pincelli y Marconi, 2010). Por todo ello, en el contexto de la piel, el folículo piloso está considerado como un pequeño órgano de carácter autónomo y que, desde el punto de vista experimental, resulta fácilmente accesible.

La controversia que rodea al uso potencial de las células troncales embrionarias en medicina regenerativa reside fundamentalmente en el desconocimiento de las consecuencias funcionales a largo plazo que puede tener su uso en un individuo adulto. Incluso la utilización de células iPS a partir de células somáticas obtenidas de tejidos adultos implica, en la mayoría de los casos, la necesidad de introducir genes exógenos (Halley-Stott y col., 2013), teniendo en cuenta que los efectos de su expresión a nivel tisular podrían tener consecuencias deletéreas en el organismo adulto. Los avances en este campo son continuos, como muestra el reciente descubrimiento de la posibilidad de reprogramar células somáticas utilizando fuertes estímulos externos, en un proceso denominado adquisición de pluripotencia desencadenada por estímulo (*stimulus-triggered acquisition of pluripotency*, STAP) (Obokata y col., 2014 a; Obokata y col., 2014 b). No obstante, las similitudes y diferencias entre las células reprogramadas obtenidas por estos métodos y las células troncales embrionarias están aún por definir (Yamanaka, 2012). Por tanto, las

implicaciones de su uso en un organismo vivo resultan en gran medida impredecibles y necesitan ser delimitadas.

Por su plasticidad, las células troncales que residen en los tejidos adultos son capaces de originar un número limitado de tipos celulares, incluso diferentes a los que componen su propio tejido de origen ([Kashofer y Bonnet, 2005](#)). Esto constituye una característica importante para el uso terapéutico de estas poblaciones celulares. Un aspecto crítico para implementar estas estrategias de forma segura y eficaz es determinar las condiciones óptimas en las que acceder a los repositorios de células troncales del organismo adulto, con el fin de llevar a cabo su expansión y manipulación *ex vivo*. En este contexto, la capacidad del TF para modular la proliferación y movilización de las células troncales del folículo piloso en el propio tejido, sin necesidad de desplazarlas fuera de su nicho biológico, constituye una aproximación experimental alternativa y novedosa, que cuenta con importantes ventajas metodológicas y éticas.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran la implicación de bajos niveles de ROS en la regulación funcional de las células troncales adultas en un tejido epitelial. Observaciones previas sugieren que el papel de las ROS *in vivo* puede ser dependiente del tejido, actuando a través de diferentes rutas de señalización en los distintos casos. Así, el mantenimiento de la quiescencia en las células troncales hematopoyéticas requiere bajos niveles intracelulares de ROS, mientras que niveles más elevados inducen proliferación ([Jang y Sharkis, 2007](#)), pudiendo limitar la vida de la célula mediante la activación de la ruta de la MAPK p38 ([Ito y col., 2006](#)). Sin embargo, niveles relativamente elevados de ROS regulan la capacidad de auto-renovación de las células troncales neurales, actuando sobre la ruta de señalización PI3K/Akt ([Le Belle y col., 2011](#)). Por otra parte, la generación de ROS dependiente de Rac1 tras la pérdida de función del gen *Apc* (*adenomatous polyposis coli*) en las células troncales del epitelio intestinal facilita la proliferación mediada por la ruta Wnt y es un factor crítico en la iniciación del crecimiento tumoral en el cáncer colorrectal ([Myant y col., 2013](#)). En este contexto, los efectos del TF en la piel muestran un papel estimulador de las ROS, de forma similar a lo observado en la activación de la proliferación de las células troncales neurales utilizando un modelo de

formación de neuroesferas *in vitro* (Le Belle y col., 2011) y en la desregulación de la proliferación de las células troncales intestinales implicada en la iniciación del cáncer colorrectal (Myant y col., 2013). Sin embargo, las células troncales epidérmicas activan su proliferación de forma transitoria en respuesta a las ROS generadas por el TF, por lo que no se induce la formación de tumores cutáneos a largo plazo como consecuencia del tratamiento.

Recientemente, Hamanaka y colaboradores han utilizado un modelo de ratón deficiente en el gen *TFAM* (*mitochondrial transcription factor A*) para investigar el papel de las ROS en la piel. Las células que carecen de la proteína TFAM, necesaria para la replicación y transcripción del genoma mitocondrial, presentan defectos en la cadena transportadora de electrones que impiden la generación de ROS en la mitocondria. Esto interfiere en la diferenciación *in vitro* de los queratinocitos y en el adecuado desarrollo de los folículos pilosos, sugiriendo de forma indirecta la implicación de las ROS mitocondriales en estos procesos (Hamanaka y col., 2013). Por otra parte, se ha demostrado que la producción de ROS tiene lugar de forma sostenida durante la regeneración de la cola previamente amputada en renacuajos de *Xenopus* y en el proceso de cicatrización de heridas en la epidermis de anfibio (Love y col., 2013) y pez zebra (Niethammer y col., 2009). En este sentido, la capacidad del TF para favorecer la regeneración de lesiones por quemadura en la piel del ratón demostrada en el presente trabajo es consistente con observaciones previas (Peplow y col., 2012) e indica que las ROS también desempeñan un papel crucial en la progresión de los procesos de cicatrización y regeneración tisular en mamíferos.

El efecto estimulador del TF sobre el ciclo de crecimiento del pelo es un resultado novedoso y sorprendente. De hecho, el TF con ALA y luz roja se ha utilizado anteriormente en humanos con el objetivo inverso, es decir, para retrasar el crecimiento del pelo (Uebelhoer y Dover, 2005). Sin embargo, su uso con esta finalidad no está extendido, debido a las importantes limitaciones impuestas por la necesidad de un largo tiempo de incubación con ALA, el dolor producido al paciente y el daño epitelial. Todos estos datos son consistentes con la hipótesis planteada en este trabajo, demostrando que, dependiendo de los niveles de ROS producidos en función de las condiciones de TF utilizadas, pueden inducirse efectos opuestos en el tejido.

En conjunto, los efectos del TF sobre la actividad de las células troncales del folículo piloso, el crecimiento del pelo y la regeneración tisular sugieren la posibilidad de modular directamente estos procesos en mamíferos, convirtiendo al TF en una herramienta de elevado interés para su aplicación potencial en biomedicina regenerativa. Además, los estudios previos en este área utilizan fuentes de ROS exógenas (principalmente peróxido de hidrógeno), recurren a modelos *in vitro* y/o utilizan el aporte o disminución de ROS de forma continuada para probar sus efectos sobre un determinado tejido o sistema biológico, lo que dificulta la caracterización del papel real desempeñado por las ROS *in vivo*. La aproximación metodológica aquí utilizada aporta una perspectiva innovadora que permite en gran medida solventar estas limitaciones, ya que se basa en la generación endógena, local y transitoria de ROS a través de la maquinaria molecular del propio tejido, por lo que permite demostrar de forma directa las implicaciones de las ROS en la respuesta fisiológica de la piel.

Estudios previos han demostrado una implicación directa de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en los procesos de regeneración tisular (Whyte y col., 2012) y en la regulación de la fase de crecimiento o anagén del folículo piloso (Plikus y col., 2008). En ausencia de estímulos, la reducida fracción de β -catenina que no se encuentra asociada a E-cadherina en las uniones adherentes se acompleja en el citoplasma con las proteínas axina, APC y glicógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β), lo que desencadena la fosforilación y degradación de β -catenina. La interacción de los factores Wnt con su receptor inicia una cascada de señalización que implica la inhibición de GSK3 β , induciendo el desacoplamiento del complejo de degradación. β -catenina es entonces susceptible de ser translocada al núcleo, donde interacciona con proteínas de la familia de factores potenciadores linfoides (*lymphoid enhancer factor*)/factores de células T (*T cell factor*), conocidos como factores Lef/Tcf, actuando como cofactor transcripcional y regulando la expresión de sus genes diana (Novak y Dedhar, 1999). En el folículo piloso existe una expresión diferencial de los diferentes factores de transcripción implicados en esta vía. Así, Tcf3 actúa como represor de la diferenciación terminal en la región prominente, donde predomina la quiescencia, mientras que la expresión de Lef1 en las células de la matriz del bulbo

regula numerosos cambios transcripcionales que promueven la proliferación, remodelación de la matriz extracelular y especificación celular en los linajes propios del folículo piloso (Blanpain y Fuchs, 2009). Además, durante el proceso de cicatrización de heridas, una señal dependiente de Wnt es capaz de inducir localmente la formación de folículos pilosos *de novo* a partir del epitelio interfolicular, recapitulando el proceso observado durante el desarrollo embrionario (Ito y col., 2007). En esta misma línea, defectos en la producción de ROS mitocondriales interfieren en la señalización Wnt, provocando la entrada prematura de los folículos en catagén y una disminución en la abundancia de β -catenina en la piel (Hamanaka y col., 2013). Por otra parte, la producción de ROS contribuye a la señalización Wnt como mediadora de la proliferación de las células troncales intestinales durante la iniciación del cáncer colorrectal (Myant y col., 2013) y numerosos estudios de ganancia y pérdida de función en ratones apuntan la importancia de la señalización Tcf/Lef1/ β -catenina en la especificación y el mantenimiento de las células troncales epiteliales (Blanpain y col., 2007; Blanpain y Fuchs, 2009).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, cabría esperar que la proliferación de las células troncales epidérmicas y los efectos funcionales observados como consecuencia del estímulo de producción de ROS inducido por el TF en la piel tuvieran lugar a través de la activación de esta ruta. No obstante, los resultados obtenidos muestran que no existe localización nuclear de β -catenina y el TF induce la represión transcripcional de genes diana de esta vía, como *Axina2* (Jho y col., 2002), *Jag1* (Estrach y col., 2006), *Ovo1* (Li y col., 2002) y *c-myc* (He y col., 1998). En conjunto, estas evidencias indican que los efectos causados en la piel por el TF tienen lugar por una vía independiente a la señalización Wnt/ β -catenina.

Los resultados obtenidos previamente utilizando queratinocitos en cultivo (Blázquez-Castro y col., 2012) sugieren la posible implicación de la proteína c-Src en el mecanismo de estimulación por TF en la piel. La quinasa c-Src contribuye a la regulación de múltiples funciones fisiológicas, incluyendo proliferación y supervivencia celular, regulación del citoesqueleto, migración y adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular (Giannoni y col., 2010). En la década de 1980, *v-Src* (de

origen viral) fue el primer oncogén descubierto y la proteína v-Src fue la primera proteína tirosina-quinasa descrita (Reynolds y col., 2013). Desde entonces, se han generado y utilizado numerosos modelos *in vitro* e *in vivo* para el estudio de las funciones celulares de la quinasa c-Src (su homólogo expresado en células no alteradas), que han permitido su sobre-expresión o la expresión de formas con mutaciones activantes. No obstante, la búsqueda de sus funciones ha sido dificultada en gran medida por la redundancia funcional entre los distintos miembros de la familia SFK. Esto explica, por ejemplo, la posibilidad de generar un modelo de ratón *c-Src*^{-/-} que, aunque a corto plazo, es viable (Soriano y col., 1991). La identificación de muchos de sus sustratos moleculares ha permitido posicionar a la quinasa c-Src como un punto clave de interconexión entre múltiples cascadas de señalización. Así, los sustratos fosforilados por c-Src pueden agruparse en dos clases principales (Brown y Cooper, 1996). Por una parte, aquéllos cuya fosforilación se observa también durante la señalización iniciada por las proteínas RTK, como PDGFR o EGFR, al ser activadas mediante la unión de sus ligandos. En este grupo de sustratos de c-Src destacan la proteína adaptadora Shc (capaz de activar la ruta Ras-MAPK), la proteína p190 (activadora de la GTPasa Rho), el factor de transcripción Stat3 (que regula la expresión de *c-myc* y *ciclina D1*) y la proteína PI3K fosfatidilinositol 3-quinasa (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*, PI3K), regulada por c-Src a través de la fosforilación de la subunidad no catalítica p85. Un segundo grupo incluye sustratos de c-Src que no se han encontrado alternativamente activados por RTK, entre los que destacan moléculas implicadas en la organización del citoesqueleto de actina —como la proteína asociada a filamentos de actina p110 (*actin filament associated protein*, AFAP110) y cortactina, ambas implicadas en regular la formación de fibras de estrés—; proteínas que desempeñan su función en las uniones célula-matriz extracelular y regulan la señalización mediada por integrinas—como FAK (quinasa de adhesión focal, *focal adhesion kinase*), tensina, talina, vinculina, paxilina y p130Cas (Cas = *Crk-associated substrate*)—; moléculas implicadas en el establecimiento de uniones adherentes célula-célula —como catenina p120Cas (Cas = *cadherin-associated Src substrate*) y placoglobina—; proteínas implicadas en la comunicación intercelular —como conexina43, cuya fosforilación por c-Src altera las uniones de tipo gap que permiten el intercambio de pequeñas moléculas e iones—; e incluso moléculas relacionadas con el

procesamiento de ARN, como Sam68 (Martin, 2001; Brown y Cooper, 1996; Reynolds y col., 2013). Mediante estas y otras interacciones, la quinasa c-Src está involucrada en la regulación de importantes vías de señalización celulares.

De acuerdo con observaciones previas realizadas *in vitro* en queratinocitos (Blázquez-Castro y col., 2012), los resultados obtenidos *in vivo* en la piel indican que el TF induce la activación de c-Src por fosforilación en la posición Tyr416, así como la acumulación transitoria de esta proteína en el epitelio interfolicular y los folículos pilosos. Apoyando este resultado, se ha descrito que existen bajos niveles de expresión y activación de c-Src en los folículos pilosos durante la fase de telogén, que se incrementan con la entrada en anagén y también lo hacen en respuesta al tratamiento con TPA, en concreto en la región prominente y la matriz del bulbo piloso (Serrels y col., 2009). Esto sugiere una relación entre los niveles de c-Src y la proliferación de los queratinocitos *in vivo*, planteando la posibilidad de que la quinasa c-Src participe en el mecanismo de movilización de las células troncales en la piel desde el estado de quiescencia. En este contexto, los resultados aportados en el presente trabajo demuestran por primera vez una conexión directa entre la estimulación de las células troncales de la región prominente del folículo piloso y el incremento en los niveles de expresión de c-Src, así como su activación por fosforilación.

Los resultados preliminares obtenidos indican que, de acuerdo con la estimulación de la proliferación de células troncales neurales en respuesta a ROS (Le Belle y col., 2011), los efectos del TF en la piel están asociados con un incremento en la fosforilación de la proteína AKT. Se ha propuesto la regulación redox de la propia AKT (Corcoran y Cotter, 2013). Además, AKT está implicada en la vía iniciada por la activación de PI3K, que tiene como efector principal a la denominada diana de la rapamicina en células de mamífero (*mammalian target of rapamycin*, mTOR), cuya activación desencadena tanto la iniciación de la traducción proteica a través de la activación de la quinasa S6 y la proteína de unión-4E 1 (*4E-binding protein 1*, 4EBP1), como la activación de la proteína quinasa C (*protein kinase C*, PKC) y la propia AKT (Huang y col., 2013). Dado que, como se ha indicado anteriormente, PI3K es susceptible de ser regulada por c-Src (Corcoran y Cotter, 2013), la activación de AKT en

respuesta al TF sugiere que la vía PI3K/AKT/mTOR podría jugar un papel especialmente importante en la transducción de la señal iniciada por la activación de c-Src en respuesta a las ROS generadas por el TF.

La señalización mediada por AKT ha sido también implicada en el control de los niveles de ROS necesarios para el adecuado mantenimiento de la homeostasis a largo plazo en células troncales hematopoyéticas (Juntilla y col., 2010). Por otra parte, en determinadas poblaciones de células tumorales se ha descrito la existencia de subpoblaciones celulares con niveles diferenciales de ROS, directamente relacionados con los niveles de activación de AKT y con la velocidad de proliferación celular. Así, las células con altos niveles de ROS y elevada activación de AKT proliferan rápidamente, mientras que existe una proporción de células con bajos niveles de ROS y AKT que se dividen con menor frecuencia. Por tanto, estas últimas se comportan como células troncales cancerígenas, que se protegen del posible daño al ADN causado por las rápidas divisiones características del tejido neoplásico. La estimulación de AKT en estas condiciones puede desplazar el equilibrio dinámico entre las divisiones simétricas y asimétricas. Esto conduce a la generación de estas células troncales cancerígenas, que actúan como una reserva celular, asegurando la capacidad de propagación del tumor (Shi y col., 2012).

En conjunto, estos resultados sugieren un papel clave de c-Src y AKT en el mecanismo de estimulación inducido por el TF en la piel y, potencialmente, en la regulación fisiológica de la actividad de las células troncales epidérmicas. No obstante, es necesario demostrar la implicación de estas moléculas en el proceso desencadenado por el TF, utilizando compuestos inhibidores de su actividad que fueran capaces de bloquear *in vivo* los efectos del TF.

La producción transitoria de ROS en la piel inducida por el TF, que promueve una activación de c-Src, está asociada a un fuerte incremento transitorio en la expresión transcripcional del gen *Prl2c3*. La proteína Prl2c3, también conocida como proliferina 2 (PLF2), pertenece a la familia de las proliferinas (PLF) o proteínas reguladas por mitógeno (*mitogen regulated proteins*, MRP), que se clasifican dentro de la superfamilia de la hormona de crecimiento prolactina (PRL) (Wang y col., 2006). El

locus PRL ha evolucionado de forma especie-específica, experimentado procesos de amplificación génica en distinto grado. En concreto, en el ratón se expande a lo largo del cromosoma 13 e incluye 23 genes. Se han identificado cuatro proteínas pertenecientes a la familia PLF (codificadas por distintos genes): Prl2c1 (o PLF); Prl2c2 (o PLF1); Prl2c3 (o PLF2), que equivale a Prl2c4 (o MRP3), y Prl2c5 (o MRP4) (Soares y col., 2007). Todas ellas comparten alrededor del 90% de su secuencia aminoacídica pero pueden diferir en su grado de glicosilación, característica que se ha relacionado con la capacidad para interaccionar con sus receptores *in vivo* (Corbacho y col., 2002). El primer tejido en el que se identificaron las PLF fue la placenta de ratón (Linzer y col., 1985), aunque posteriormente se observó la inducción de su expresión en la piel tras la generación de heridas y en los folículos pilosos (Fassett y Nilsen-Hamilton, 2001), lo que sugiere que podrían desempeñar un papel en la regulación del proceso de reparación tisular y el ciclo del pelo. De hecho, la expresión del gen *Mrp3* en queratinocitos primarios en cultivo es inducida por el factor de crecimiento de queratinocitos (*keratinocyte growth factor*, KGF), también conocido como factor de crecimiento de fibroblastos 7 (*fibroblast growth factor*, FGF7) (Fassett y Nilsen-Hamilton, 2001). Esto es coherente con los cambios a nivel transcripcional observados en la piel en respuesta al TF, ya que el análisis de expresión a gran escala permitió identificar una inducción de *Prl2c3* y *KGF*, por lo que el producto proteico de este último podría estar actuando como regulador de la expresión de *Prl2c3 in vivo*.

Existen indicios que involucran a la proteína Prl2c3 en la regulación de las células troncales de distintos tejidos. Así, se ha descrito su implicación en la expansión *in vitro* de células troncales hematopoyéticas (Choong y col., 2003). Además, el factor paracrino Musashi1 (Msi1), inicialmente caracterizado como marcador de células multipotentes neurales, induce la proliferación de las células troncales epiteliales de la glándula mamaria mediada por el incremento de Prl2c2 (o PLF1) secretada (Wang y col., 2008). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, junto con estas observaciones previas, permiten atribuir a Prl2c3 un novedoso papel en la regulación de la proliferación de las células troncales epidérmicas.

Las proteínas de la familia PLF pueden ser reconocidas por el receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo 2 o receptor de manosa-6-fosfato (*insuline-like*

growth factor receptor type 2/manose-6-phosphate receptor), conocido como receptor IGF-2/M6P, aunque existen muy pocos datos acerca de las vías de señalización activadas por esta unión ligando-receptor (El-Shewy y Luttrell, 2009). En las células troncales hematopoyéticas, se desconoce el mecanismo por el cual estos factores regulan la proliferación. En las células troncales mamarias, parece que Prl2c2 (o PLF-1) podría activar a ERK a través de la interacción con el receptor IGF-2/M6P, que a su vez inhibe a GSK3 β , induciendo la activación de las vías Wnt y Notch (Wang y col., 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo descartan que este mismo mecanismo esté actuando en la piel tras la aplicación del TF, por lo que son necesarios estudios adicionales para determinar las posibles vías de señalización activadas por PI2c3 en este tejido.

Dado que todos los genes de la superfamilia PRL proceden de la duplicación de un gen ancestral común (Wiemers y col., 2003), los estudios realizados con PRL son un punto de partida adecuado para caracterizar los mecanismos moleculares implicados en la señalización mediada por las proteínas de la familia PLF. Las proteínas codificadas por este conjunto de genes parálogos comparten, por tanto, ciertas características, por lo que podrían establecer interacciones moleculares similares y desempeñar funciones antagónicas o sinérgicas. En este sentido, PRL y su receptor (PRLR) se expresan en el folículo piloso de ratón en función de la fase del ciclo, induciendo la entrada en regresión o catagén (Foitzik y col., 2003). Además, el ciclo del pelo está desfasado en ratones que carecen del gen que codifica PRLR, presentando un ritmo acelerado con respecto a los correspondientes controles (Craven y col., 2001). Asimismo, el trasplante de piel obtenida a partir de ratones deficientes en PRLR a ratones cuya señalización endocrina funciona con normalidad tiene como resultado el acortamiento de la fase de telogén (Craven y col., 2006). Estos datos sugieren que las señales desencadenadas por PRL inhiben la progresión del ciclo folicular. Indudablemente, la generación de un modelo de ratón que permita eliminar de forma condicional el gen *Prl2c3* podría aportar información muy valiosa relacionada con las funciones de su producto proteico.

En este contexto, la vía Src/PI3K/AKT se activa en respuesta a la unión de PRL a su receptor de membrana en células de linfoma, induciendo una cascada de señales

que tiene como resultado la proliferación a través de la estimulación de la expresión de *c-myc* (Domínguez-Cáceres y col., 2004). Los resultados obtenidos en la piel indican que el TF induce la activación de c-Src y AKT pero implica la represión de *c-myc*, por lo que Prl2c3 podría estimular la proliferación en la piel a través de la inducción de la expresión de otros genes. Además, como consecuencia del TF, Prl2c3 no solo se acumula en los queratinocitos del epitelio hiperplásico, sino que es translocada al compartimento nuclear. Esto sugiere que esta proteína de tipo hormona podría estar desempeñando funciones nucleares. Aunque no existen evidencias previas de la localización nuclear de Prl2c3, se ha descrito la translocación de prolactina al núcleo en células de linfoma. De hecho, el mecanismo de translocación nuclear de la prolactina y su efecto mitogénico son bloqueados mediante el uso de inhibidores de la actividad tirosina-quinasa e inhibidores de PKC (Rao col., 1995). Teniendo en cuenta los resultados preliminares que indican un incremento de la señalización mediada por c-Src y AKT en respuesta al TF en la piel, así como la estimulación de la proliferación, sería interesante estudiar si la translocación nuclear de Prl2c3 inducida por el TF tiene lugar por un mecanismo similar. Un análisis genómico a gran escala de tipo *ChIP-on-chip* utilizando muestras de piel sometida a TF podría aportar nuevos datos sobre las potenciales dianas transcripcionales de Prl2c3, contribuyendo a la caracterización de los mecanismos por los cuales esta proteína regula la proliferación celular de las células troncales de la piel.

En conjunto, los resultados de este trabajo indican que la producción endógena, local y transitoria de ROS inducida por el TF con m-ALA y luz roja en la piel es capaz de regular la actividad de las células troncales residentes en el nicho de la región prominente del folículo piloso. Este estímulo de producción de ROS modula *in vivo* importantes aspectos de la homeostasis cutánea, como la proliferación del epitelio interfolicular, el crecimiento del pelo y la regeneración tisular (**Fig. 18**).

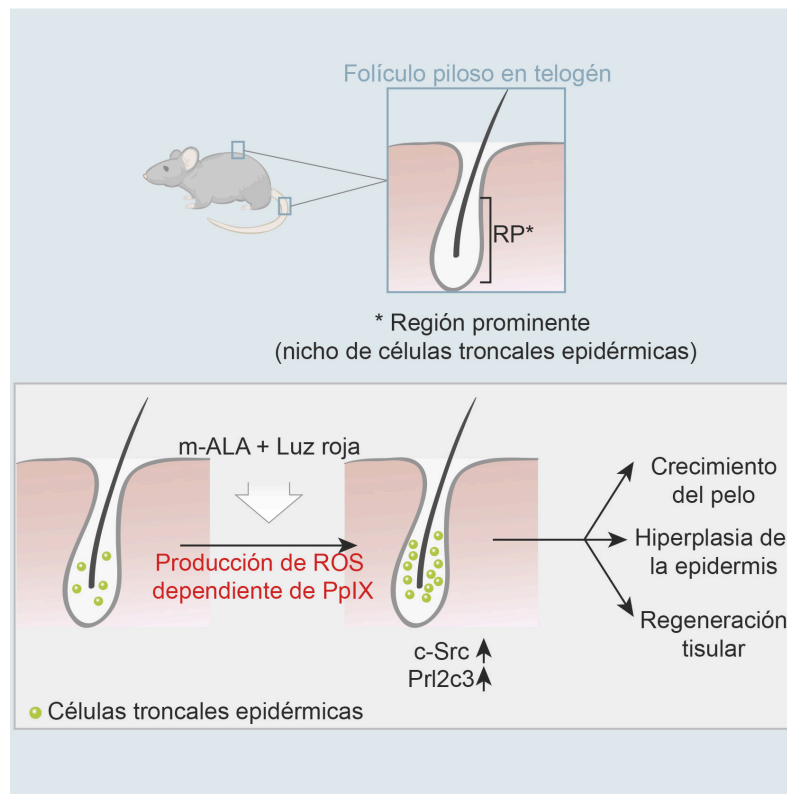


Fig. 18 | Representación esquemática de los principales eventos desencadenados por el TF en la piel y el folículo piloso.

La señalización redox en las células troncales adultas constituye un aspecto especialmente relevante. Esto se debe a que ha sido implicada en el establecimiento de la decisión entre la permanencia en estado indiferenciado para el mantenimiento de la auto-renovación y la activación del programa de diferenciación específica de linaje (Piccoli y col., 2013). Esta decisión es intrínseca a la función de las células troncales y tiene importantes implicaciones fisiológicas y patológicas. Por tanto, la caracterización de los mecanismos que regulan este equilibrio es importante, tanto a nivel teórico como práctico, y tiene un enorme potencial clínico, particularmente en el campo de la medicina regenerativa. No obstante, se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares por los que las ROS regulan la función celular, los diferentes contextos biológicos en los que tiene lugar esta regulación y sus implicaciones a nivel sistémico. En este sentido, los resultados presentados en este trabajo pueden contribuir a la caracterización de los mecanismos de regulación redox que actúan en la piel y aportan, además, una nueva aproximación experimental para abordar *in vivo* este tipo de estudios.

IV. Conclusiones

De los resultados obtenidos, se extraen las siguientes conclusiones:

- 1.- El tratamiento fotodinámico con m-ALA y luz roja induce la producción endógena, local y transitoria de ROS *in vivo*, que estimula de forma transitoria la proliferación en el nicho de células troncales de la región prominente de folículo piloso y la hiperplasia del epitelio interfolicular.
- 2.- La activación de la proliferación en los distintos compartimentos de la piel en respuesta al tratamiento fotodinámico no constituye un estímulo tumorigénico, ya que no induce la formación de tumores a largo plazo.
- 3.- La producción endógena de ROS inducida por el tratamiento fotodinámico regula distintos aspectos de la homeostasis cutánea, activando el crecimiento del pelo durante la fase de reposo o telogén y acelerando el proceso de regeneración tisular en lesiones producidas por quemadura. Estos resultados demuestran que bajos niveles de ROS regulan *in vivo* la función del tejido.
- 4.- Los efectos del tratamiento fotodinámico en la piel están asociados a una activación de c-Src por fosforilación, así como a la acumulación de esta proteína en las células del epitelio interfolicular y los folículos pilosos, sugiriendo su implicación en el mecanismo molecular que media la estimulación tisular dependiente de ROS, aún poco caracterizado.
- 5.- La producción endógena de ROS inducida por el tratamiento fotodinámico altera de forma específica y transitoria el patrón de expresión génica global de la piel, activando significativamente la expresión de genes de la familia 2 subfamilia c de la prolactina, particularmente *Prl2c3*, y reprimiendo *c-myc* y dianas transcripcionales de la ruta Wnt/b-catenina, como *Axina2*, *Jag1* y *Ovol1*.
- 6.- La proteína *Prl2c3* incrementa su expresión y es translocada al núcleo de las células de la epidermis en respuesta al estímulo fotodinámico, indicando la existencia de un mecanismo de regulación de la homeostasis cutánea que implica un papel fundamental y hasta ahora desconocido de esta proteína, que puede ser una potencial diana terapéutica en biomedicina regenerativa.

VII. Bibliografía

- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 61:250-81, 2011.
- Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100 Suppl 1:11830-5, 2003.
- Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 26:118-32, 2010.
- Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol.* 77:1303-15, 2009.
- Bickenbach JR. Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res.* 60 Spec No C:1611-20, 1981.
- Bito T, Nishigori C. Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways. *J Dermatol Sci.* 68:3-8, 2012.
- Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:207-17, 2009.
- Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell.* 128:445-58, 2007.
- Blázquez-Castro A, Carrasco E, Calvo MI, Jaén P, Stockert JC, Juarranz A, Sáenz-Rodríguez F, Espada J. Protoporphyrin IX-dependent photodynamic production of endogenous ROS stimulates cell proliferation. *Eur J Cell Biol.* 91:216-23, 2012.
- Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337:1-13, 2004.
- Borum K. Influence of clipping and chemical epilation on hair growth in mice. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 43:127-40, 1958.
- Braathén LR, Morton CA, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Gerritsen MJ, Gilaberte Y, Calzavara-Pinton P, Sidoroff A, Wulf HC, Szeimies RM. Photodynamic therapy for skin field cancerization: an international consensus. *International Society for*

- Photodynamic Therapy in Dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 26:1063-6, 2012.
- Braun KM, Niemann C, Jensen UB, Sundberg JP, Silva-Vargas V, Watt FM. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development.* 130:5241-55, 2003.
- Brown MT y Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta.* 1287:121-49, 1996.
- Bryan N, Ahswini H, Smart N, Bayon Y, Wohler S, Hunt JA. Reactive oxygen species (ROS)--a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. *Eur Cell Mater.* 24:249-65, 2012.
- Carrasco E, Calvo MI, Espada J. DNA labeling in vivo: quantification of epidermal stem cell chromatin content in whole mouse hair follicles using Fiji image processing software. *Methods Mol Biol.* 1094:79-88, 2014.
- Chiarugi P, Cirri P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 28:509-14, 2003.
- Chiarugi P. Src redox regulation: there is more than meets the eye. *Mol Cells.* 26:329-37, 2008.
- Chiu J, Dawes IW. Redox control of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 22:592-601, 2012.
- Choong ML, Tan AC, Luo B, Lodish HF. A novel role for proliferin-2 in the ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *FEBS Lett.* 550:155-62, 2003.
- Clayton E, Doupe DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, Jones PH. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature.* 446:185-9, 2007.
- Corbacho AM, Martínez De La Escalera G, Clapp C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol.* 173:219-38, 2002.
- Corcoran A, Cotter TG. Redox regulation of protein kinases. *FEBS J.* 280:1944-65, 2013.

- Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61:1329-37, 1990.
- Cotsarelis, G. Epithelial stem cells: a folliculoventric view. *J Invest Dermatol.* 126:1459-68, 2006.
- Craven AJ, Nixon AJ, Ashby MG, Ormandy CJ, Blazek K, Wilkins RJ, Pearson AJ. Prolactin delays hair regrowth in mice. *J Endocrinol.* 191:415-25, 2006.
- Craven AJ, Ormandy CJ, Robertson FG, Wilkins RJ, Kelly PA, Nixon AJ, Pearson AJ. Prolactin signaling influences the timing mechanism of the hair follicle: analysis of hair growth cycles in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology.* 142:2533-9, 2001.
- Dai T, Kharkwal GB, Zhao J, St Denis TG, Wu Q, Xia Y, Huang L, Sharma SK, d'Enfert C, Hamblin MR. Ultraviolet-C light for treatment of *Candida albicans* burn infection in mice. *Photochem Photobiol.* 87:342-9, 2011.
- Domínguez-Cáceres MA, García-Martínez JM, Calcabrini A, González L, Porque PG, León J, Martín-Pérez J. Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells. *Oncogene.* 23:7378-90, 2004.
- El-Shewy HM, Luttrell LM. Insulin-like growth factor-2/mannose-6 phosphate receptors. *Vitam Horm.* 80:667-97, 2009.
- Estrach S, Ambler CA, Lo Celso C, Hozumi K, Watt FM. Jagged 1 is a beta-catenin target gene required for ectopic hair follicle formation in adult epidermis. *Development.* 133:4427-38, 2006.
- Fassett JT, Nilsen-Hamilton M. Mrp3, a mitogen-regulated protein/proliferin gene expressed in wound healing and in hair follicles. *Endocrinology.* 142:2129-37, 2001.
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nuessenzweig M, Nussenzweig A. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 3:959-67, 2004.
- Foitzik K, Krause K, Nixon AJ, Ford CA, Ohnemus U, Pearson AJ, Paus R. Prolactin and its receptor are expressed in murine hair follicle epithelium, show hair cycle-dependent expression, and induce catagen. *Am J Pathol.* 162:1611-21, 2003.

- Forni MF, Trombetta-Lima M, Sogayar MC. Stem cells in embryonic skin development. *Biol Res.* 45:215-22, 2012.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 116:769-78, 2004.
- Fuchs E. Finding one's niche in the skin. *Cell Stem Cell* 4:499-502, 2009.
- Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature.* 445:834-42, 2007.
- Gandarillas A. The mysterious human epidermal cell cycle, or an oncogene-induced differentiation checkpoint. *Cell Cycle.* 11:4507-16, 2012.
- García-Olmo D, García-Verdugo JM, Alemany J, Gutierrez-Fuentes JA. *Cell Therapy.* McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. Madrid, 2008.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119:493-501, 1992.
- Gianni D, Bohl B, Courtneidge SA, Bokoch GM. The involvement of the tyrosine kinase c-Src in the regulation of reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase-1. *Mol. Biol. Cell* 19:2984-94, 2008.
- Giannoni E, Taddei ML, Chiarugi P. Src redox regulation: again in the front line. *Free Radic Biol Med.* 49:516-27, 2010.
- Giannoni E, Taddei ML, Chiarugi P. Src redox regulation: again in the front line. *Free Radic Biol Med.* 2010 49:516-27, 2010.
- Goldstein J, Horsley V. Home sweet home: skin stem cell niches. *Cell Mol Life Sci.* 69:2573-82, 2012.
- Gurdon JB. The egg and the nucleus: a battle for supremacy. *Development.* 140:2449-56, 2013.
- Halley-Stott RP, Pasque V, Gurdon JB. Nuclear reprogramming. *Development.* 140:2468-71, 2013.
- Hamanaka RB, Glasauer A, Hoover P, Yang S, Blatt H, Mullen AR, Getsios S, Gottardi CJ, DeBerardinis RJ, Lavker RM, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species

- promote epidermal differentiation and hair follicle development. *Sci Signal*. 6:ra8, 2013.
- Hanasoge S, Ljungman M. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis* 28:2298-304, 2007.
- Hardy, MH. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet*. 8:55-61, 1992.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 281:1509-12, 1998.
- Huang T, Lin X, Meng X, Lin M. Phosphoinositide-3 Kinase/Protein Kinase-B/Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Psoriasis Pathogenesis. A Potential Therapeutic Target? *Acta Derm Venereol*. [Epub ahead of print], 2013.
- Ishizuka M, Abe F, Sano Y, Takahashi K, Inoue K, Nakajima M, Kohda T, Komatsu N, Ogura S, Tanaka T. Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int Immunopharmacol*. 11:358-65, 2011.
- Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 12:446-51, 2006.
- Jaks V, Kasper M, Toftgård R. The hair follicle-a stem cell zoo. *Exp Cell Res*. 316:1422-8, 2010.
- Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. *Int J Biochem Cell Biol*. 44:847-50, 2012.
- Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 110:3056-63, 2007.
- Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway *Mol Cell Biol*. 22:1172-83, 2002.

- Jordan CT. Cancer stem cells: controversial or just misunderstood? *Cell Stem Cell*. 4:203-5, 2009.
- Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol*. 10:148-54, 2008.
- Juntilla MM, Patil VD, Calamito M, Joshi RP, Birnbaum MJ, Koretzky GA. AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. *Blood*. 2010 May 20;115(20):4030-8, 2010.
- Kashofer K, Bonnet D. Gene therapy progress and prospects: stem cell plasticity. *Gene Ther*. 12:1229-34, 2005.
- Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. J. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *Photochem Photobiol B*. 6:143-8, 1990.
- Kohl E, Torezan LA, Landthaler M, Szeimies RM. Aesthetic effects of topical photodynamic therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 24:1261-9, 2010.
- Koike M, Mashino M, Sugasawa J, Koike A. Dynamic change of histones H2AX phosphorylation independent of ATM and DNA-PK in Mouse skin in situ. *Biochem Biophys Res Commun*. 363:1009-12, 2007.
- Kovacic P, Somanathan R. Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. *Curr Neuropharmacol*. 10:289-302, 2012.
- Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:13473-5, 2000.
- Le Belle JE, Orozco NM, Paucar AA, Saxe JP, Mottahedeh J, Pyle AD, Wu H, Kornblum HI. Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell*. 8:59-71, 2011.
- Lee J, Tumber T. Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling. *Semin Cell Dev Biol*. 23:906-16, 2012.
- Lei MX, Chuong CM, Widellitz RB. Tuning Wnt signals for more or fewer hairs. *J Invest Dermatol*. 133:7-9, 2013.

- Levy V, Lindon C, Harfe BD, Morgan BA. Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev Cell*. 9:855-61, 2005.
- Levy V, Lindon C, Zheng Y, Harfe BD, Morgan BA. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J*. 21(7):1358-66, 2007.
- Li B, Mackay DR, Dai Q, Li TW, Nair M, Fallahi M, Schonbaum CP, Fantes J, Mahowald AP, Waterman ML, Fuchs E, Dai X. The LEF1/beta -catenin complex activates *moval*, a mouse homolog of *Drosophila ovo* required for epidermal appendage differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:6064-9, 2002.
- Linzer DI, Lee SJ, Ogren L, Talamantes F, Nathans D. Identification of proliferin mRNA and protein in mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:4356-9, 1985.
- Liu Y, Lyle S, Yang Z, Cotsarelis G. Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J Invest Dermatol*. 121:963-8, 2003.
- Love NR, Chen Y, Ishibashi S, Kritsiligkou P, Lea R, Koh Y, Gallop JL, Dorey K, Amaya E. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat Cell Biol*. 15:222-8, 2013.
- Martin GS. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:467-75, 2001.
- Mimeault M, Batra SK. Recent advances on skin-resident stem/progenitor cell functions in skin regeneration, aging and cancers and novel anti-aging and cancer therapies. *J Cell Mol Med*. 14:116-34, 2010.
- Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, De Bari C. Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res*. 313:3377-85, 2007.
- Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol*. 22:411-7, 2004.
- Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, Chung CH, Lu B. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol*. 2011:941876, 2011.
- Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus R. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol*. 117:3-15, 2001.

- Myant KB, Cammareri P, McGhee EJ, Ridgway RA, Huels DJ, Cordero JB, Schwitalla S, Kalna G, Ogg EL, Athineos D, Timpson P, Vidal M, Murray GI, Greten FR, Anderson KI, Sansom OJ. ROS production and NF- κ B activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation. *Cell Stem Cell*. 12:761-73, 2013.
- Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 459:996-9, 2009.
- Novak A, Dedhar S. Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci*. 56:523-37, 1999.
- Obokata H, Sasai Y, Niwa H, Kadota M, Andrabi M, Takata N, Tokoro M, Terashita Y, Yonemura S, Vacanti CA, Wakayama T. Bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency. *Nature*. 505:676-80, 2014.
- Obokata H, Wakayama T, Sasai Y, Kojima K, Vacanti MP, Niwa H, Yamato M, Vacanti CA. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature*. 505:641-7, 2014.
- Ohyama M. Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci*. 46:81-9, 2007.
- Page ME, Lombard P, Ng F, Göttgens B, Jensen KB. The epidermis comprises autonomous compartments maintained by distinct stem cell populations. *Cell Stem Cell*. 13:471-82, 2013.
- Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 46:214-23, 2013.
- Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, Nesland JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer*. 79:2282-308, 1997.
- Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Photodynamic modulation of wound healing: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg*. 30:118-48.

- Pérez VI, Bokov A, Van Remmen H, Mele J, Ran Q, Ikeno Y, Richardson A. Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim. Biophys. Acta.* 1790:1005-14, 2009.
- Piccoli C, Agriesti F, Scrima R, Falzetti F, Di Ianni M, Capitanio N. To breathe or not to breathe: the haematopoietic stem/progenitor cells dilemma. *Br J Pharmacol.* 169:1652-71, 2013.
- Pincelli C, Marconi A. Keratinocyte stem cells: friends and foes. *J Cell Physiol.* 225:310-5, 2010.
- Plikus MV, Mayer JA, de la Cruz D, Baker RE, Maini PK, Maxson R, Chuong CM. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature* 451:340-4, 2008.
- Rao YP, Buckley DJ, Olson MD, Buckley AR. Nuclear translocation of prolactin: collaboration of tyrosine kinase and protein kinase C activation in rat Nb2 node lymphoma cells. *J Cell Physiol.* 163:266-76, 1995.
- Reynolds AB, Kanner SB, Bouton AH, Schaller MD, Weed SA, Flynn DC, Parsons JT. SRChing for the substrates of Src. *Oncogene.* [Epub ahead of print], 2013.
- Rizvi AZ, Wong MH. Epithelial stem cells and their niche: there's no place like home. *Stem Cells.* 23:150-65, 2005.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 3:1101-8, 2008.
- Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol.* 19:R132-42, 2009.
- Serrels B, Serrels A, Mason SM, Baldeschi C, Ashton GH, Canel M, Mackintosh LJ, Doyle B, Green TP, Frame MC, Sansom OJ, Brunton VG. A novel Src kinase inhibitor reduces tumour formation in a skin carcinogenesis model. *Carcinogenesis.* 30:249-57, 2009.
- Shi C, Zhu Y, Su Y, Cheng T. Stem cells and their applications in skin-cell therapy. *Trends Biotechnol.* 24:48-52, 2006.
- Shi X, Zhang Y, Zheng J, Pan J. Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxid Redox Signal.* 16:1215-28, 2012.

- Soares MJ, Alam SM, Duckworth ML, Horseman ND, Konno T, Linzer DI, Maltais LJ, Nilsen-Hamilton M, Shiota K, Smith JR, Wallis M. A standardized nomenclature for the mouse and rat prolactin superfamilies. *Mamm Genome*. 18:154-6, 2007.
- Solanas G, Benitah SA. Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14:737-48, 2013.
- Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*. 64:693-702, 1991.
- Sun TT, Cotsarelis G, Lavker RM. Hair follicular stem cells: the bulge activation hypothesis. *J Invest Dermatol*. 96:77S-78S, 1991.
- Szeimies RM, Karrer S, Abels C, Landthaler M, Elmetts CA. Photodynamic therapy in dermatology. Krutmann J, Hönigsmann, H Elmetts CA (editores). *Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods*. Springer, 2009.
- Szeimies RM, Morton CA, Sidoroff A, Braathen LR. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Acta Derm Venereol*. 85:483-90, 2005.
- Terskikh VV, Vasiliev AV, Vorotelyak EA. Label retaining cells and cutaneous stem cells. *Stem Cell Rev*. 8:414-25, 2012.
- Tscharntke, M., Pofahl, R., Chrostek-Grashof, A., Smyth, N., Niessen, C., Niemann, C., Hartwig, B., Herzog, V., Klein, H.W., Krieg, T., Brakebusch, C. y Haase, I. Impaired epidermal wound healing *in vivo* upon inhibition or deletion of Rac1. *J. Cell Sci*. 120:1480-1490, 2007.
- Tumbar T, Fuchs E. Epithelial skin stem cells. *Handbook of Stem Cells*. Vol.2:257-67 2004.
- Uebelhoer NS, Dover JS. Photodynamic therapy for cosmetic applications. *Dermatol Ther*. 18:242-52, 2005.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39:44-84, 2007.

- Wang JW, Jiang YN, Huang CY, Huang PY, Huang MC, Cheng WT, Shen CK, Ju YT. Proliferin enhances microvilli formation and cell growth of neuroblastoma cells. *Neurosci Res.* 56:80-90, 2006.
- Wang X, Fang H, Huang Z, Shang W, Hou T, Cheng A, Cheng H. Imaging ROS signaling in cells and animals. *J Mol Med (Berl)* 91:917-27, 2013.
- Wang XY, Yin Y, Yuan H, Sakamaki T, Okano H, Glazer RI. Musashi1 modulates mammary progenitor cell expansion through proliferin-mediated activation of the Wnt and Notch pathways. *Mol Cell Biol.* 28:3589-99, 2008.
- Whyte JL, Smith AA, Helms JA. Wnt signaling and injury repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a008078, 2012.
- Wiemers DO, Shao LJ, Ain R, Dai G, Soares MJ. The mouse prolactin gene family locus. *Endocrinology.* 144:313-25, 2003.
- Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell.* 10:678-84, 2012.
- Yamanaka Y, Ralston A. Early embryonic cell fate decisions in the mouse. *Adv Exp Med Biol.* 695:1-13, 2010.